

Optimierung der mobilen Phase und instrumenteller Parameter in der Kapillar-Elektrochromatographie mit gepackten Kapillarsäulen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Andreas Banholczer

aus Herborn

Marburg/Lahn 1999

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 21. 4. 1999
angenommen

Erstgutachterin: Priv. Doz. Dr. U. Pyell
Zweitgutachter: Prof. Dr. Ing. B. Neidhart

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 5. 1999

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	I
II Verzeichnis oft gebrachter Abkürzungen und Symbole	V
1 Einführung und Problemstellung.....	1
2 Grundlagen	3
2.1 Grundbegriffe der Chromatographie	3
2.2 Berechnung der Retentionsfaktoren und der linearen elektroosmotischen Fließgeschwindigkeit in teilgepackten Kapillarsäulen	6
2.3 Grenzen der Mikro-Hochleistungs- flüssigkeitschromatographie	7
2.4 Elektroosmotischer Fluß	8
2.5 Komponenten und Funktion eines Geräts für die Kapillar-Elektrochromatographie.....	10
2.6 Gegenwärtiger Entwicklungsstand der Kapillar-Elektrochromatographie.....	12
3 Verwendetes chromatographisches System.....	15
3.1 Verwendete Kapillarsäulen	15
3.2 Herstellung der Kapillarsäulen.....	16
3.2.1 Verwendetes Kapillarmaterial	16
3.2.2 Konstruktion der Abschlußfritten.....	16
3.2.3 Durchführung des Packvorgangs.....	17
3.2.4 Erzeugung des Detektionsfensters	20
3.3 Aufbau und Funktion des verwendeten Geräts für isokratische Kapillar-Elektrochromatographie	21
3.4 Angaben zur Zusammensetzung der mobilen Phase	23

3.5 Meßwertaufnahme und Auswertung	23
4 Photometrische Detektion in der	
Kapillar-Elektrochromatographie	24
4.1 Einführung	24
4.2 Signalverstärkung bei In-column-Detektion	25
4.3 Experimentelle Überprüfung der	
vorhergesagten Signalverstärkung	26
4.4 Abhängigkeit der Linearität der Kalibrierfunktion	
vom Detektionsmodus	30
4.5 Einfluß des Detektionsmodus auf die Nachweisgrenze	34
4.6 Wiederholpräzision	38
5 Optimierung der Probenaufgabe	41
5.1 Elektrokinetische Probenaufgabe	41
5.2 Berechnung der maximalen Probenpfropflänge	42
5.3 Experimentelle Überprüfung	44
5.4 Berechnung optimaler Probenaufgabeparameter	49
5.5 Anreicherung des Analyten bei der Probenaufgabe	50
6 Einfluß der Zusammensetzung der mobilen Phase	
auf elektrochromatographische Trennungen	54
6.1 Einführung	54
6.2 Variation der Ionenstärke der mobilen Phase	54
6.2.1 Einfluß der Ionenstärke auf den	
elektroosmotischen Fluß	54
6.2.2 Einfluß der Ionenstärke auf die Retention	
der Analyte und die Trennstufenhöhe	59
6.3 Variation des Modifiziergehalts der mobilen Phase	63
6.3.1 Einfluß des Modifiziergehalts auf den	
elektroosmotischen Fluß	63

6.3.2 Einfluß des Modifiziergehalts auf die Retention der Analyte und die Trennstufenhöhe	69
6.4 Auswahl des organischen Modifiers der mobilen Phase	73
6.4.1 Einführung.....	73
6.4.2 Einfluß des organischen Modifiers auf den elektroosmotischen Fluß	76
6.4.3 Einfluß des organischen Modifiers auf die Trenneigenschaften.....	79
6.5 Ternäre mobile Phasen	83
7 Einsatz von Fließmittelgradienten in der Kapillar-Elektrochromatographie	88
7.1 Vorteile der Gradientenelution	88
7.2 Aufbau der Gradientenapparatur	91
7.3 Funktionsüberprüfung der Gradientenapparatur	93
7.3.1 Durchführung der Probenaufgabe	93
7.3.2 Bestimmung des druckgetriebenen Anteils des Flusses der mobilen Phase	97
7.3.3 Bestimmung der erreichbaren Effizienz	99
7.3.4 Überprüfung der Genauigkeit des gelieferten Gradienten.....	101
7.3.5 Wiederholpräzision	105
7.4 Trennungen unter Anwendung von Fließmittelgradienten	108
7.4.1 Trennung von Benzoesäureestern.....	108
7.4.2 Trennung von polyzyklischen Kohlenwasser- stoffen mit binären Fließmittelgradienten	113
7.4.3 Trennung von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen bei Gradientenelution mit Dimethylsulfoxid- haltiger mobiler Phase	118

8 Zusammenfassung	122
9 Literaturverzeichnis.....	124
10 Anhang	135
10.1 Verwendete Chemikalien	135
10.2 Verwendete Geräte.....	136

II Verzeichnis oft gebrachter Abkürzungen und Symbole

A	Peakfläche
A_n	normierte Peakfläche
$A_{n,I}$	normierte Peakfläche bei ICD
$A_{n,O}$	normierte Peakfläche bei OCD
AcCN	Acetonitril
c	Konzentration
C	Coulomb
CE	Kapillar-Elektrophorese
CEC	Kapillar-Elektrochromatographie
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
d_p	mittlerer Partikeldurchmesser
E	elektrische Feldstärke
EOF	Elektroosmotischer Fluß
$E_{(\lambda)}$	Extinktion
F	Flußrate
F_I	Korrekturfaktor zur Berechnung $L_{I,max}$
F(R)	Rauschfaktor
H	Bodenhöhe
μ -HPLC	Mikro-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I	Ionenstärke
I.D.	Innendurchmesser
ICD	In-column-Detektion
k	Retentionsfaktor

L	Länge
L _D	Länge bis zum Detektor
L _G	Gesamtlänge
L _I	Probenpfropflänge
L _p	Länge des gepackten Teils der Kapillarsäule
L _u	Länge des ungepackten Teils der Kapillarsäule
LC	Flüssigkeitschromatographie
LOD	Nachweisgrenze
m	Steigung
m _I	Steigung bei ICD
m _O	Steigung bei OCD
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl
n _D	Brechungsindex
N	Trennstufenzahl
O.D.	Außendurchmesser
OCD	On-column-Detektion
ODS	Octadecylsilan
p	Druck
PAH	Polyzyklischer Kohlenwasserstoff
PEEK	Poly-Ether-Ether-Keton
R	Auflösung
RP	Reversed-phase

RSD	relative Standardabweichung
S_I	Signalintensität bei ICD
S_O	Signalintensität bei OCD
S_I/S_O	Signalverstärkung bei ICD gegenüber OCD
S/R	Signal/Rauschverhältnis
t	Zeit
t_0	Totzeit
t_I	Probenaufgabedauer
$t_{I,max}$	maximal zulässige Probenaufgabedauer
t_r	Bruttoretentionszeit
T	Temperatur
THF	Tetrahydrofuran
U	Trennspannung
U_I	Probenaufgabespannung
$U_{I,max}$	maximal zulässige Probenaufgabespannung
v	lineare Fließgeschwindigkeit
v_{eo}	lineare elektroosmotische Fließgeschwindigkeit
v_G	lineare Gesamt-Fließgeschwindigkeit
v_{pd}	lineare druckgetriebene Fließgeschwindigkeit
v/v	Volumenverhältnis
$w_{1/2}$	Halbwertsbreite

α	Selektivität
δ	Dicke der elektrischen Doppelschicht
ε_0	elektrische Feldkonstante
ε_r	relative Dielektrizitätskonstante
ζ	elektrokinetisches Potential
η	Viskosität
λ	Wellenlänge
μ_{eo}	elektroosmotische Beweglichkeit
σ	Oberflächenladungsdichte
σ^2	Varianz
φ	Volumenanteil
φ_M	Volumenanteil der mobilen Phase
$\varphi(\text{Mod})$	Volumenanteil des organischen Modifiers in der mobilen Phase

1 Einführung und Problemstellung

Die Kapillar-Elektrochromatographie (CEC) ist eine miniaturisierte elektroseparative Methode, die in den letzten Jahren stark an Beachtung gewonnen hat [1]. Als Trennprinzip wird in der CEC die Verteilung der Analyte zwischen einer mobilen und einer stationären Phase genutzt. Der Antrieb der mobilen Phase erfolgt durch einen elektrischen Feldgradienten. Aufgrund der Besonderheiten des sich einstellenden elektroosmotischen Flusses (EOF) läßt sich in der CEC gegenüber der Mikro-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (μ -HPLC) [2] eine Steigerung der Effizienz erzielen. Gleichzeitig lassen sich Packungsmaterialien kleineren Partikeldurchmessers verwenden. So gelangt man zu kürzeren Trennsäulen und kürzeren Analysezeiten, ohne Einbußen bei der Effizienz des chromatographischen Systems in Kauf nehmen zu müssen. Diese Vorteile gegenüber der μ -HPLC erklären maßgeblich das gegenwärtig starke Interesse an der CEC.

Gegenüber der Kapillar-Elektrophorese (CE) [3] können mit der CEC auch unpolare Analyte getrennt werden. Diese Möglichkeit bietet von den elektroseparativen Methoden sonst nur noch die Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) [4]. Mit der CEC werden im Falle geladener Analyte beide Trennmechanismen, unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit und Verteilung, genutzt.

Obwohl bereits eine Vielzahl von Applikationen beschrieben wurde [1], ist die CEC derzeit noch im Stadium der Methodenentwicklung. Dabei ist die reproduzierbare Herstellung robuster und effizienter Kapillarsäulen ein Arbeitsschwerpunkt [5 - 7]. Ferner sind instrumentelle und chromatographische Parameter den speziellen Erfordernissen der CEC anzupassen, um eine optimale Trennleistung und den Einsatz in der Routineanalytik zu ermöglichen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Möglichkeiten zur photometrischen Detektion in der CEC mit gepackten Kapillarsäulen auszuloten. Dabei sollten zwei mögliche Detektionsmodi, Detektion im ungepackten Teil der Kapillarsäule (On-column-Detektion, OCD) und im gepackten Teil (In-column-Detektion, ICD) miteinander verglichen werden.

In der CEC trägt die Probeninjektion stark zur Signalverbreiterung bei [8]. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen Bandenverbreiterung und Probenpfropflänge zu untersuchen. Ferner sollte geprüft werden, ob sich optimale Injektionsbedingungen in der CEC aus leicht zugänglichen chromatographischen Größen bestimmen lassen.

Besonders wichtig für die Verfahrensentwicklung in der CEC ist eine genaue Kenntnis des Einflusses der Zusammensetzung der mobilen Phase und der Oberflächeneigenschaften der stationären Phase auf die elektroosmotische Beweglichkeit und die Trenneigenschaften des chromatographischen Systems. In diesem Zusammenhang wurden bereits verschiedene Untersuchungen durchgeführt [9 -11]. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgesuchte organische Lösungsmittel auf ihre Eignung als Bestandteil mobiler Phasen in der CEC zu überprüfen. Ebenso sollte der Einfluß der Ionenstärke und des Wassergehalts der mobilen Phase auf die elektroosmotische Beweglichkeit und die Trenneigenschaften des chromatographischen Systems untersucht werden. Es wurde auch überprüft, ob sich die Selektivität des chromatographischen Systems durch ternäre mobile Phasen gezielt verbessert läßt.

In der HPLC werden seit langem Fließmittelgradienten eingesetzt. Diese Technik sollte in der CEC erprobt werden. Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war es daher, apparative Entwicklungen für den Aufbau eines Gradienten-CEC-Systems zu leisten und dessen Leistungsfähigkeit exemplarisch zu überprüfen.

2 Grundlagen

2.1 Grundbegriffe der Chromatographie

Im folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten chromatographischen Größen beschrieben.

In der Theorie der Böden wird die chromatographische Säule als ein System hintereinander geschalteter Trennstufen beschrieben. Die Anzahl dieser Trennstufen (Zahl der theoretischen Böden) N ist ein Maß für die Effizienz des chromatographischen Systems. Dabei ist das System um so effizienter, je größer N ist. Unter dem chromatographischen System werden hier die verwendete mobile und stationäre Phase verstanden. N berechnet sich nach Gl. 1.

$$N = \frac{t_r^2}{\sigma^2} = 5,545 \cdot \frac{t_r^2}{w_{1/2}^2} \quad (1)$$

t_r = Bruttoretentionszeit

σ^2 = Peakvarianz (in Zeiteinheiten)

$w_{1/2}$ = Halbwertsbreite des Peaks (in Zeiteinheiten)

Aus der Länge L der Säule und der Trennstufenzahl N berechnet sich die Trennstufenhöhe (Höhe eines theoretischen Bodens) H nach Gl. 2:

$$H = \frac{L}{N} \quad (2)$$

L = Länge der Säule

N = Trennstufenzahl

Um die Trennleistung von Säulen mit Packungsmaterial mit verschiedenem mittleren Partikeldurchmesser d_p zu vergleichen, ist es sinnvoll, die reduzierte Bodenhöhe h anzugeben. Diese wird nach Gl. 3 berechnet.

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (3)$$

Der Retentionsfaktor k ist ein Maß für die Tendenz einer Substanz, sich bevorzugt in der mobilen oder der stationären Phase aufzuhalten. k kann nach Gl. 4 berechnet werden.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (4)$$

t_0 = Totzeit

Damit zwei Substanzen mit einem gegebenen chromatographischen System getrennt werden können, müssen sich ihre Retentionfaktoren hinreichend voneinander unterscheiden. Als Maß für die Selektivität des Trennsystems für zwei Substanzen wird der Selektivitätsfaktor α angegeben (Gl. 5).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (k_2 > k_1) \quad (5)$$

k_1 = Retentionsfaktor von Substanz 1

k_2 = Retentionsfaktor von Substanz 2

Die Auflösung R zweier benachbarter Peaks kann nach Gl. 6 berechnet werden und ist ein Maß für die Trennung zweier Substanzen.

$$R = 2 \frac{t_{r,2} - t_{r,1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \frac{t_{r,2} - t_{r,1}}{w_{1/2,1} + w_{1/2,2}} \quad (6)$$

$$(t_{r,2} > t_{r,1})$$

$t_{r,1}, t_{r,2}$ = Bruttoretentionszeit von Substanz 1 bzw. 2

w_1, w_2 = Basisbreite von Peak 1 bzw. 2

$w_{1/2,1}, w_{1/2,2}$ = Halbwertsbreite des Peaks 1 bzw. 2

Die Gesamtvarianz eines Peaks σ_{Ges}^2 , die ein Maß für die Verbreiterung des Peaks ist, setzt sich nach Gl. 7 aus den Anteilen der Varianzen durch Streudiffusion (Diffusion der Analyte durch verschieden lange Kanäle in der stationären Phase, "Eddy-Diffusion") σ_{Eddy}^2 , Longitudinaldiffusion der Analyte σ_{Diff}^2 , Widerstand im Massenübergang in der stationären Phase σ_s^2 und der mobilen Phase σ_m^2 und Peakverbreiterungen außerhalb der Trennsäule σ_{Extra}^2 zusammen.

$$\sigma_{\text{Ges}}^2 = \sigma_{\text{Eddy}}^2 + \sigma_{\text{Diff}}^2 + \sigma_s^2 + \sigma_m^2 + \sigma_{\text{Extra}}^2 \quad (7)$$

Eddy-Diffusion, Logitudinaldiffusion und die Widerstände im Massenübergang haben in Abhängigkeit von der linearen Fließgeschwindigkeit v der mobilen Phase einen unterschiedlichen Beitrag zu H . Dieser Zusammenhang wird durch die VAN-DEEMTER-Gleichung (Gl. 8) beschrieben [12].

$$H = A + B/v + C_m v + C_s v \quad (8)$$

A = Term der Streudiffusion

B = Term der Molekulardiffusion

C_m = Term des Widerstands im Massenübergang in der mobilen Phase

C_s = Term des Widerstands im Massenübergang in der stationären Phase

Die Gleichungen 1 und 6 gelten streng genommen nur für GAUSS-förmige Peaks. Die in dieser Arbeit angegebenen Werte für N und R wurden unter der Annahme GAUSS-förmiger Signale nach diesen Gleichungen berechnet.

2.2 Berechnung der Retentionsfaktoren und der linearen elektro-osmotischen Fließgeschwindigkeit in teilgepackten Kapillarsäulen

In teilgepackten Kapillarsäulen steht der mobilen Phase im gepackten Teil ein um einen Faktor ϕ_M kleineres Volumen als im ungepackten Teil zur Verfügung. ϕ_M ist der Volumenanteil der mobilen Phase im gepackten chromatographischen Bett und beträgt in gepackten Kapillarsäulen bei Verwendung poröser Silikagele als Packungsmaterial ca. 0,7. Da der Volumenfluß durch die Kapillarsäule konstant ist, beträgt die Geschwindigkeit v der mobilen Phase im ungepackten Teil der Kapillarsäule $\phi_M \cdot v_{eo}$. v_{eo} ist die Geschwindigkeit der mobilen Phase im gepackten Teil, und läßt sich bei Verwendung teilgepackter Kapillarsäulen nach Gl. 9 aus t_0 berechnen.

$$v_{eo} = \frac{L_P + L_u / \phi_M}{t_0} \quad (9)$$

L_P = Länge des gepackten Teils der Kapillarsäule, L_u = Länge des ungepackten Teils der Kapillarsäule bis zum Detektor

Bei der Berechnung des Retentionsfaktors k eines Analyten ist zu berücksichtigen, daß der Analyt sich innerhalb des gepackten Teils mit einer Geschwindigkeit $v = (1/(1+k)) \cdot v_{eo}$ bewegt. Im ungepackten Teil wird er nicht länger retardiert. Hier ist seine Wanderungsgeschwindigkeit gleich $\phi_M \cdot v_{eo}$. Diese Überlegungen führen zu Gl. 10.

$$k = \frac{v_{eo} \cdot t_r}{L_P} - \frac{L_u}{L_P \cdot \phi_M} - 1 \quad (10)$$

2.3 Grenzen der Mikro-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Über Jahre hinweg hat die Verkleinerung der Trennsäulen und des Partikel-Durchmessers der Packungsmaterialien in der HPLC zu einer Steigerung der Trennstufenzahl und der Geschwindigkeit chromatographischer Trennungen geführt. Einer weiteren Verkleinerung der HPLC sind allerdings Grenzen gesetzt. Der Druck, der nötig ist, um die mobile Phase mit angemessener linearer Geschwindigkeit durch die Packung zu bewegen, wächst mit dem Quadrat des reziproken Werts des Partikeldurchmessers der Packungsteilchen. Bei $d_p < 3 \mu\text{m}$ ist der Rückdruck der Packung so groß, daß er sich mit üblichen HPLC-Pumpen nicht mehr überwinden läßt [13]. In der CEC wird dagegen der EOF zum Antrieb der mobilen Phase durch offene beschichtete oder gepackte Quarzglas kapillaren genutzt. Damit läßt sich im Falle gepackter Kapillarsäulen theoretisch der Partikeldurchmesser auf $d_p = 0,5 \mu\text{m}$ senken, ohne Einbußen bei der linearen Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase in Kauf nehmen zu müssen [9]. Dies ermöglicht den Aufbau hocheffizienter Trennsysteme, wie sie sich mit der HPLC nicht realisieren lassen.

2.4 Elektroosmotischer Fluß

An jeder Phasengrenzfläche fest-flüssig bildet sich eine elektrische Doppelschicht aus [14]. Im Falle silikatischer Materialien entsteht diese durch Dissoziation der endständigen Silanolgruppen, wobei ein negativer Ladungsüberschuß an der Oberfläche des Materials verbleibt. Diese negative Ladung wird durch Kationen in der Lösung kompensiert. Bei diesen Ionen handelt es sich um die aus der Dissoziation der Silanolgruppen stammenden H^+ -Ionen und anderen in der Lösung befindlichen Kationen. Die Doppelschicht besteht aus einer starren Schicht fest sorbierter Ionen an der Oberfläche der festen Phase (STERN- oder HELMHOLTZ-Schicht), darauf folgt eine diffuse Schicht beweglicher Ionen (GOUY-CHAPMAN-Schicht). Aufgrund der Ladungstrennung an der Phasengrenzfläche entsteht ein elektrisches Potential, das in der starren Schicht mit dem Abstand zur festen Phase linear und in der diffusen Schicht exponentiell abnimmt. Das Potential an der Grenzfläche zwischen der starren und der diffusen Schicht heißt elektrokinetisches Potential ζ . Bei gepackten Quarzglaskapillaren findet der beschriebene Vorgang sowohl an der Kapillarwand als auch an der Oberfläche der silikatischen Packungsteilchen statt.

Wird an die Kapillare ein elektrisches Feld angelegt, bewegen sich die Kationen des diffusen Teils der elektrischen Doppelschicht in Richtung zur Kathode [15]. Durch Reibungskräfte zwischen den Kationen und der umgebenden Lösung wird diese in gleicher Weise beschleunigt; es bildet sich ein dem angelegten Feld proportionaler elektroosmotischer Fluß (EOF) aus. Da der EOF an der Oberfläche der Kanäle zwischen den Packungsteilchen, bzw. den Packungsteilchen und der Kapillarwand generiert wird, hat er im Gegensatz zum parabolischen Flußprofil des druckgetriebenen Flusses ein kolbenförmiges Profil, d.h. die Fließgeschwindigkeit innerhalb eines Kanals ist unabhängig vom Abstand des betrachteten Flüssigkeitspakets zur Kanalwand (Plug-flow). Gleichzeitig ist die mittlere

Fließgeschwindigkeit im Gegensatz zum druckgetriebenen Fluß unabhängig vom Kanaldurchmesser (Abb. 1).

Die genannten Eigenschaften des EOF verringern aus mehreren Gründen die Trennstufenhöhe H . In der Flüssigkeitschromatographie beschreibt die VAN-DEEMTER-Gleichung (Gl. 8) den Einfluß verschiedener Parameter in Abhängigkeit von der linearen Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase v auf H und auf die Verbreiterung des chromatographischen Signals.

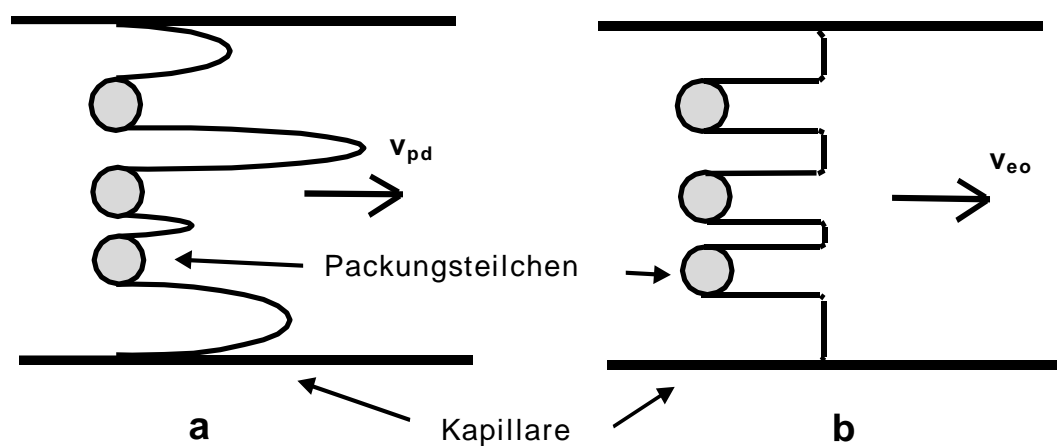


Abb. 1: Druckgetriebenes (a) und elektroosmotisches Flußprofil (b)
 (v_{pd} : lineare Fließgeschwindigkeit des druckgetriebenen Flusses,
 v_{eo} : lineare Fließgeschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses)

Die Größe des A-Terms der VAN-DEEMTER-Gleichung wird unter anderem von Unterschieden in den Fließgeschwindigkeiten der mobilen Phase durch verschiedene Kanäle zwischen den Packungsteilchen bestimmt. Dieser Beitrag zum A-Term wird bei annähernd gleicher Fließgeschwindigkeit in allen Kanälen, wie im Falle des EOF, kleiner. Die Geschwindigkeitsverteilung der Flüssigkeitspakete innerhalb eines Kanals beeinflusst die Größe des C_m -Terms der VAN-DEEMTER-Gleichung. Bei Verwendung elektroosmotisch getriebener mobiler Phasen sind infolge des Plug-flow die Fließgeschwindigkeiten der Flüssigkeitspakete weniger breit verteilt

als im Falle druckgetriebener mobiler Phasen. Dies bedeutet eine Verkleinerung des C_m -Terms [11].

Durch den in der Kapillare generierten EOF wird auch die Verwendung von Packungsmaterialien mit $d_p < 1,5 \mu\text{m}$ möglich, wodurch der Beitrag der Streudiffusion (A-Term der VAN-DEEMTER-Gleichung) weiter verkleinert wird. Gegenüber Säulen mit Packungsmaterial mit größerem d_p bedeutet dies, daß die Länge der Trennstrecke verkürzt werden kann, ohne die Trennstufenzahl zu vermindern. Dadurch wird der Zeitaufwand pro Analyse verkleinert.

Daß die CEC der μ -HPLC in Hinblick auf die Trennleistung tatsächlich überlegen ist, konnten KNOX und GRANT eindrucksvoll demonstrieren [9]. Sie betrieben dieselbe Kapillarsäule im HPLC- und im CEC-Modus. Während im ersten Fall eine reduzierte Bodenhöhe von $h \approx 2$ erreicht wurde, konnte diese im zweiten Fall mit $h \approx 1,3$ deutlich verringert werden.

2.5 Komponenten und Funktion eines Geräts für die Kapillar-Elektrochromatographie

Den prinzipiellen Aufbau eines CEC-Chromatographen gibt Abb. 2 wieder. Als Trennsäulen finden meist gepackte Quarzglaskapillaren mit einem inneren Durchmesser (I.D.) von 50 bis 320 μm Verwendung. Es können generell alle für die HPLC üblichen Packungsmaterialien als stationäre Phase benutzt werden. Dabei hat ihre Auswahl nach zwei Gesichtspunkten zu erfolgen. Erstens muß ihre Oberfläche ein hinreichend großes elektrokinetisches Potential ermöglichen, um an ihr einen stabilen und hinreichend schnellen EOF erzeugen zu können. Zweitens muß sie zur Trennung der betreffenden Analyte geeignet sein. Diese Eigenschaften erfüllen die in der CEC meist eingesetzten Reversed-phase (RP) - Materialien [16].

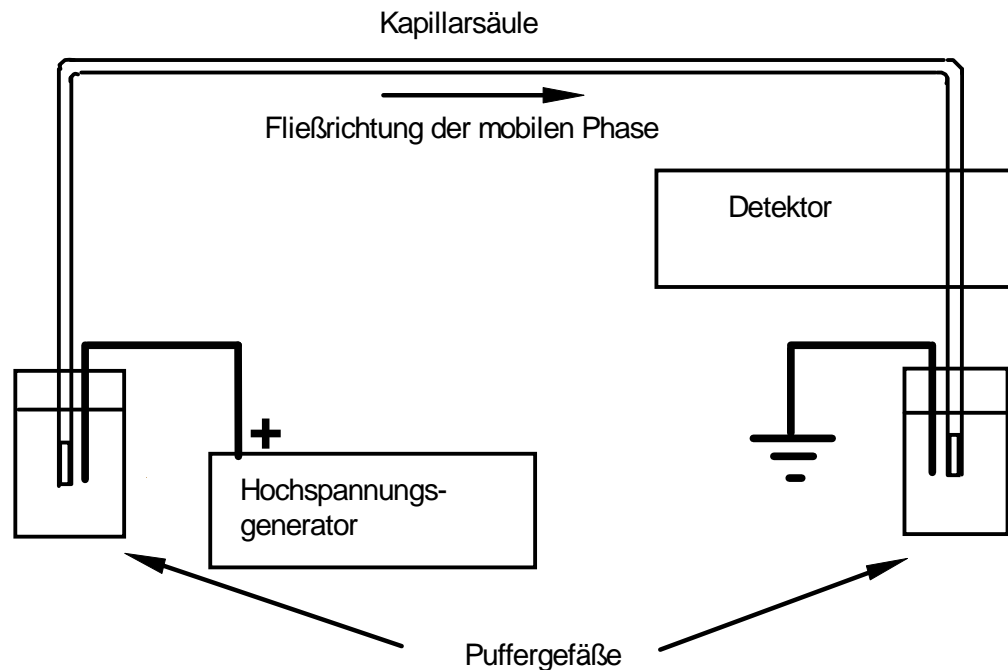


Abb. 2: Aufbau eines CEC-Chromatographen

In der CEC wird auch mit offenen beschichteten Kapillarsäulen (I.D. 10 - 50 μm) gearbeitet [17, 18]. Ungelöste Probleme bei der Injektion und Detektion der sehr kleinen Probenvolumina, die in Kapillarsäulen mit Innendurchmessern weniger μm auftreten, erschweren jedoch ihre Anwendung. Auch neigen diese Kapillarsäulen zur Volumenüberladung infolge der geringen Oberfläche der stationären Phase. Deshalb werden heute vorzugsweise gepackte Kapillarsäulen in der CEC eingesetzt [1].

Als mobile Phasen haben sich Gemische aus Acetonitril (AcCN) und einer wäßrigen Pufferlösung bewährt. Der Volumenanteil des AcCN beträgt dabei meist 60 - 90%. In wenigen Fällen wurde AcCN durch andere Lösungsmittel ersetzt [11] oder es wurden wasserfreie mobile Phasen eingesetzt [19]. Diese mobilen Phasen zeigten sich gegenüber AcCN-haltigen in Bezug auf Stabilität und Geschwindigkeit des EOF und der Effizienz des chromatographischen Systems deutlich unterlegen.

Die Probenaufgabe erfolgt in der CEC meist elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung an die Kapillarsäule für wenige Sekunden. Seltener erfolgt die Probenaufgabe hydrostatisch durch Anlegen einer Druckdifferenz an die Kapillarsäule für wenige Sekunden. Die Detektion erfolgt meist photometrisch oder fluorimetrisch. Als Detektionszelle wird ein kurzer Teil der Kapillarsäule selbst genutzt. Grundsätzlich kann in der Packung (In-column-Detektion, ICD) oder außerhalb der Packung (On-column-Detektion, OCD) detektiert werden [20]. Aufgrund des geringen Volumenflusses durch die Kapillarsäulen, sind Kopplungen der CEC mit der Massenspektrometrie besonders einfach durchzuführen (CEC-MS). Als Ionisierungstechniken finden Electrospray-ionization (ESI) [21] und Continous-flow-fast-atomic-bombardement-ionization (CF-FAB) [22] Verwendung.

Abschließend sei erwähnt, daß sich aufgrund der großen apparativen Ähnlichkeit zwischen der CEC und der CE viele kommerzielle CE-Geräte mit gepackten Kapillarsäulen ausrüsten lassen.

2.6 Gegenwärtiger Entwicklungsstand der Kapillar-Elektrochromatographie

Seit ihrer erstmaligen Beschreibung 1974 durch PRETORIUS et al. [23] hat sich die CEC stark weiterentwickelt. So sind mittlerweile eine Vielzahl von Applikationen beschrieben worden. Besonders erfolgreich wurde sie zur Trennung von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) eingesetzt. So konnten ADAM und UNGER [24] die Trennung der 16 PAH, deren Analyse mittels Gradienten-HPLC durch die Enviromental Protection Agency der USA beschrieben wird (EPA-PAH), im isokratischen Modus trennen. Dies ist mit der HPLC nur bei Anwendung eines Fließmittelgradienten möglich. YAN et al. [25] konnten 15 der 16 EPA-PAH isokratisch trennen. Dabei erreichten sie Trennstufenzahlen von $N = 100.000-140.000$ pro

Meter Trennstrecke, was nach ihren Angaben etwa dem 1,5 fachen der mit der μ -HPLC erreichbaren Trennstufenzahl entspricht.

Beide Arbeitsgruppen nutzten eine stationäre Phase ohne Selektivität für unterschiedliche Molekülgeometrien. In der HPLC werden zur Trennung von PAH meist stationäre Phasen mit Selektivität für verschiedene Molekülgeometrien (shape selectivity) verwendet.

Auch zur Trennung pharmazeutischer Verbindungen wurde die CEC benutzt. EUERBY et al. [26] trennten verschiedene Diuretika und Steroide. Im Falle der Steroide übertrugen sie eine etablierte HPLC-Methode auf die CEC und konnten dabei zwei Stereoisomere des Tipredans vollständig trennen, die bei Einsatz der HPLC nicht zu trennen waren. SMITH und EVANS [27] erreichten bei der Trennung des Steroids Fluticason-Propionat von strukturverwandten Verbindungen reduzierte Bodenhöhen mit Werten kleiner eins.

Die Trennung chiraler Verbindungen ist mit der CEC ebenfalls möglich. LELIÈVRE et al. [28] nutzten dazu Cyclodextrine sowohl als Additiv zur mobilen Phase als auch in an die stationäre Phase gebundener Form. In beiden Fällen gelang die Trennung der Signale beider Enantiomere des Chlorthalidons bis zur Basislinie.

Der Einsatz von Fließmittelgradienten verspricht auch in der CEC eine Steigerung der Trennleistung. YAN et al. [29] nutzten den elektroosmotischen Effekt zur Förderung zweier mobiler Phasen unterschiedlicher Zusammensetzung zur Formung eines binären Fließmittelgradienten. Damit gelang ihnen die Trennung aller 16 EPA-PAH. Auch die Nutzung herkömmlicher HPLC-Pumpen zur Gradientenerzeugung in der CEC wurde beschrieben [21].

Für die Einführung der CEC in die Routineanalytik ist die Robustheit der Kapillarsäulen von großer Bedeutung. DULAY et al. [5] konnten zeigen, daß sich die gepackten Kapillarsäulen über Wochen ohne Verlust an Effizienz bei hoher Wiederholpräzision in Bezug auf die Retention der Analyte und die erzielbare Auflösung für aneinandergrenzende Peaks betreiben lassen.

Allerdings ist die Herstellung der Kapillarsäulen noch problembeladen: Zum einen lassen sich Partikel mit $d_p \leq 1,5 \mu\text{m}$ mit der üblichen Druckfiltrationsmethode nur schwierig packen [30], zum anderen wird mit diesen Trennsäulen noch nicht die theoretisch mögliche Trennstufenzahl erreicht [31]. Als Ursache für die vergleichsweise geringe Trennstufenzahl bei Verwendung von Packungsmaterialien mit einem $d_p \leq 1,5 \mu\text{m}$ werden die die Packung haltenden Abschlußfritten angesehen [8]. Diese Fritten werden auf vielfältige Weise hergestellt. Am stärksten etabliert hat sich die Methode nach BOUGHTFLOWER et al. [6], bei der die Fritten direkt aus dem Packungsmaterial bei hohem Druck thermisch erzeugt werden. In letzter Zeit finden monolithische Trennsäulen verstärkt Beachtung [7, 32]. Dabei wird die stationäre Phase durch Polymerisation eines geeigneten Materials direkt in der Kapillarsäule erzeugt. Das Problem der Frittenanfertigung entfällt somit.

Sollten die Probleme bei der Herstellung der Kapillarsäulen beseitigt werden, dürfte dem Einzug der CEC in das Routinelabor nichts mehr im Wege stehen. So bereiten einige Hersteller ihre Produktpalette bereits darauf vor, und es gibt auch erste Anbieter von gepackten Kapillarsäulen.

3 Verwendetes chromatographisches System

3.1 Verwendete Kapillarsäulen

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich gepackte Kapillarsäulen verwendet. Diese wurden selbst hergestellt. Die Abb. 3 a und 3 b zeigen schematisch den Aufbau einer vollständig gepackten Kapillarsäule für ICD und einer teilgepackten Kapillarsäule für OCD.

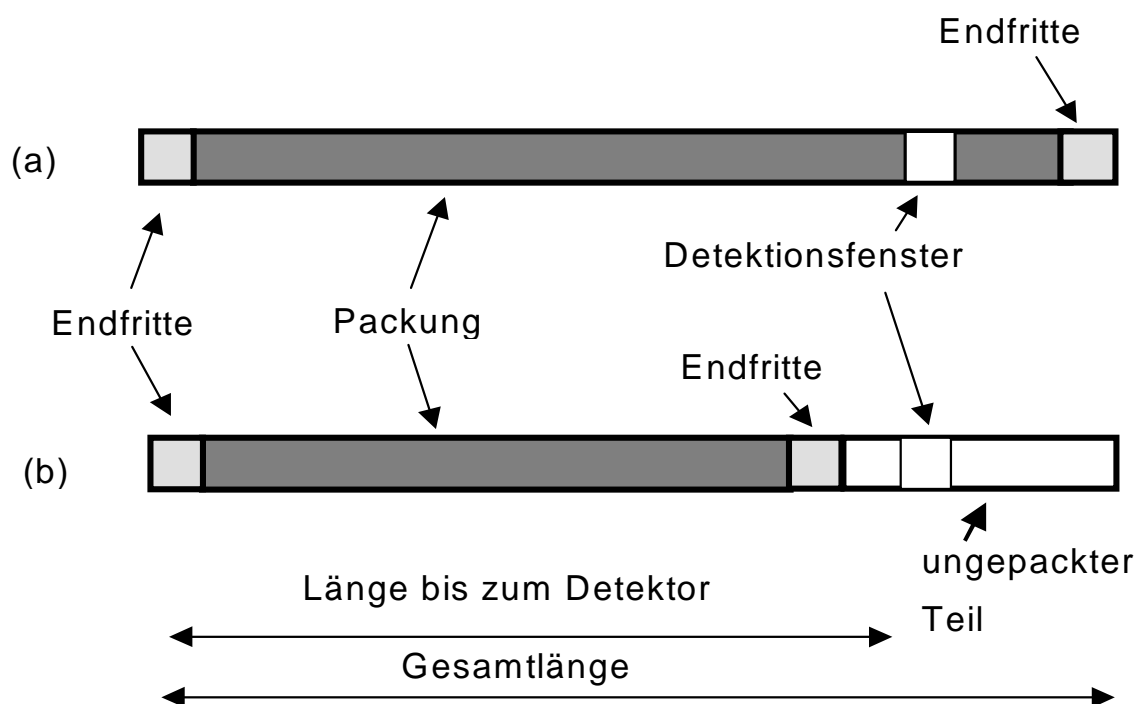


Abb 3: Schematische Darstellung einer vollständig gepackten Kapillarsäule für ICD (a) und einer teilgepackten Kapillarsäule für OCD (b)

Die Dimensionen der Kapillarsäulen werden im Text wie folgt angegeben:

Gesamtlänge (Länge bis zum Detektor) \times I.D.

Aufgrund der Bauart des verwendeten UV/Vis-Detektors befand sich im Falle vollständig gepackter Kapillarsäulen (ICD) das Detektionsfenster ca.

5 cm vor der detektorseitigen Abschlußfritte. Im Falle teilgepackter Kapillarsäulen befand sich das Detektionsfenster stets ca. 5 cm nach der detektorseitigen Fritte.

3.2 Herstellung der Kapillarsäulen

3.2.1 Verwendetes Kapillarmaterial

Als Kapillarmaterial wurden Kapillaren aus Quarzglas eingesetzt, die aufgrund ihrer Eigenschaften gut für die CEC geeignet sind: Sie leiten nicht den elektrischen Strom, sind UV-durchlässig und inert gegenüber den in der CEC verwendeten mobilen Phasen. Die Kapillaren hatten einen I.D. von 100 - 180 μm und einen Außendurchmesser (O.D.) von ca. 330 μm . Zum Packen wurden Stücke von ca. 30 - 50 cm Länge mit einem Kapillarschneider zurechtgeschnitten.

3.2.2 Konstruktion der Abschlußfritten

Um die Packung in der Kapillarsäule zu fixieren, muß diese an beiden Enden mit Fritten abgeschlossen werden. Die Fritten müssen mechanisch stabil sein, da die Kapillarsäulen nur unter Druck konditioniert werden können. Gleichzeitig müssen sie zur Aufrechterhaltung des EOF permeabel sein und ein vergleichbares elektrokinetisches Potential wie die Packung ermöglichen. Für die CEC sind Fritten beschrieben worden, die auf die Kapillarsäule aufgesteckt werden [33]. Mit dieser Technik werden allerdings Totvolumina erzeugt, die zu einer Erhöhung der externen Bandenverbreiterung führen. Besser geeignet sind Fritten, die direkt in der Kapillare erzeugt werden. Solche Fritten stellten KENNEDY und JORGENSEN [34] aus nativem Silikagel her, das sie mit einer Mischung aus Wasserglas und Wasser befeuchteten. Das Ende der Kapillare wurde in diese Mischung getaucht und der so in die Kapillare gedrückte Silika-

gel-Pfropf anschließend thermisch gesintert. Dieses Verfahren wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Zunächst wurde vor dem Packen an einem Ende der Kapillare eine Fritte hergestellt. Dazu wurde natives Silikagel mit $d_p = 3 \mu\text{m}$ verwendet. Zum Sintern der Fritte diente eine Glühwendel mit einer Leistung $P = 2,5 \text{ W}$. Die Heizdauer betrug 30 s. Die Fritte wurde nach dem Sintern unter dem Mikroskop auf ihre Homogenität geprüft. Zur Überprüfung ihrer Permeabilität wurde Wasser aus einer Spritze manuell durch die Säule gepreßt. Ließ sich das Wasser ohne großen Widerstand durch die Kapillare drücken, wurde sie zum Packen verwendet. Ansonsten wurde eine neue Fritte hergestellt.

Nach dem Packen wurde am anderen Ende der Kapillare ebenfalls eine Fritte erzeugt. Dazu kamen zwei Methoden zur Anwendung. Meist wurde die Packung auf ca. 1 mm mittels Ultraschall entfernt und die Fritte nach der oben beschriebenen Methode hergestellt. Teilweise wurde diese Fritte nach der Methode von BOUGHTFLOWER et. al. hergestellt [6]. Dazu verblieb die Kapillare nach dem Packvorgang an der Packapparatur und es wurde bei $p = 600 \text{ bar}$ Wasser durch die Kapillare gepumpt. Die Kapillare wurde an der gewünschten Stelle mit einer Glühwendel ($P = 2,5 \text{ W}$, Heizdauer 30 s) erhitzt, wodurch aus dem Packungsmaterial eine Fritte gesintert wurde. Dabei wurde das Packungsmaterial nicht pyrolysiert.

3.2.3 Durchführung des Packvorgangs

Als Packungsmaterialien kamen ausschließlich mit Octadecylsilan (ODS) modifizierte Silikagele zum Einsatz. Meist wurde Silikagel mit einem d_p von $3 \mu\text{m}$ eingesetzt (Nucleosil 100-3 ODS, Macherey-Nagel). Daneben wurde Silikagel mit einem d_p von $1,5 \mu\text{m}$ benutzt (YMC ODS $1,5 \mu\text{m}$, YMC Europe).

Die Kapillaren wurden mit der Druckfiltrationsmethode gepackt. Bei dieser Methode wird das Packungsmaterial in einer geeigneten Aufschlämmlösung suspendiert und unter hohem Druck in die Kapillare gepreßt [34]. Weitere Methoden zum Herstellen gepackter Kapillarsäulen sind das Ziehen gepackter Glasröhrchen [9] und die elektrophoretische Wanderung des Packungsmaterials in die Kapillare [35]. Beide Methoden treten aber an Bedeutung weit hinter die Druckfiltrationsmethode zurück. Als Suspensionsflüssigkeit wurde AcCN gewählt. AcCN benetzt die Oberfläche des RP- Packungsmaterials gut, was eine Voraussetzung für die Bildung einer stabilen Suspension ist. Die geringe Viskosität dieses Lösungsmittels ermöglicht während des Packens einen hohen Volumenfluß durch die Kapillare und damit kurze Packzeiten.

Zum Packen wurden zunächst 100 mg Packungsmaterial in 1 mL AcCN suspendiert und 15 min im Ultraschallbad homogenisiert. Diese Suspension wurde in eine HPLC-Säule ($L = 4\text{ cm}$, $I.D. = 4\text{ mm}$) gegeben, die als Packautoklav diente. Eine Seite der HPLC-Säule wurde mit dem offenen Ende der Kapillare verschraubt. Das andere Ende der HPLC-Säule wurde mit einer pneumatischen Pumpe (Haskel DSTV-122) verbunden. Dann wurde die Suspension bei $p = 600\text{ bar}$ in die Kapillare gepumpt, wobei das Packungsmaterial durch die zuvor hergestellte Fritte in der Kapillare zurückgehalten wurde. Die Fritte wurde während des Packens durch eine Hilfsfritte stabilisiert. Die Hilfsfritte bestand aus einem Glaswollepfropf in einem Stück Teflonschlauch ($I.D. = 300\text{ }\mu\text{m}$), das auf die Kapillare aufgesteckt wurde. Ein Stück einer ungepackten Kapillare, das in das andere Ende des Teflonschlauchs gesteckt wurde, verhinderte ein Herausdrücken des Glaswollepfropfs durch die Suspensionsflüssigkeit. Als Pumpflüssigkeit wurde Wasser verwendet. Während des Packvorgangs wurde die Suspension im Packautoklav mit einem Magnetrührer gerührt. Als Rührstäbchen diente ein mit Teflonschlauch überzogenes Stück Draht. Die Kapillare wurde während des Packvorgangs mit Ultraschall behandelt. Der Aufbau des Packungsbettes in der Kapillare war im Falle des $3\text{ }\mu\text{m}$

Packungsmaterials meist nach wenigen Minuten abgeschlossen. Dabei wurden Packungen der Länge $L = 30 - 50 \text{ cm}$ hergestellt. Bei Verwendung des $1,5 \mu\text{m}$ Packungsmaterials dauerte der Aufbau eines ca. 20 cm langen Packungsbetts bis zu 20 min . Die längere Packzeit im Falle des $1,5 \mu\text{m}$ Packungsmaterials erklärt sich aus dem größeren Rückdruck der sich aufbauenden Packung und der daraus resultierenden geringen Fließgeschwindigkeit der Suspension. Die Kapillare verblieb nach dem Packvorgang noch 1 h im Ultraschallbad, um die Packung zu sedimentieren. Die Packapparatur ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

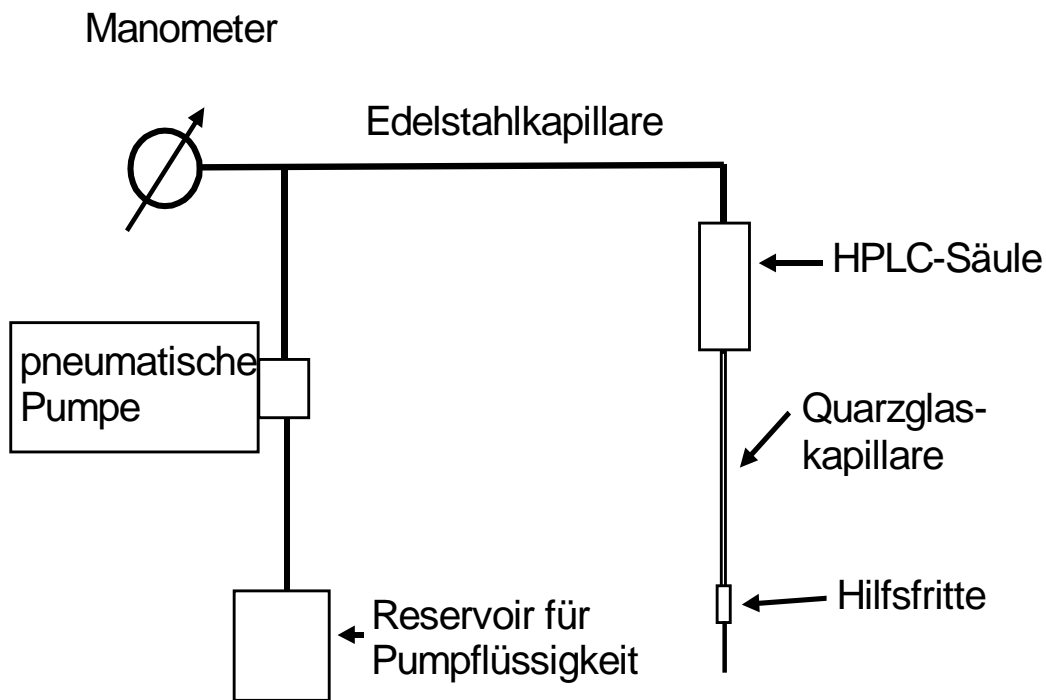


Abb. 4: Schematische Darstellung der Packapparatur

3.2.4. Erzeugung des Detektionsfensters

Die Kapillaren sind zur Erhöhung der Bruchfestigkeit mit einer Schicht aus Polyimid ("Coating") überzogen, welches im Bereich des ultravioletten und sichtbaren Lichts eine hohe Absorption aufweist. Deshalb muß zur photometrischen oder fluorimetrischen Detektion ein Detektionsfenster auf der Kapillarsäulen durch Entfernen des Coatings erzeugt werden. Im gepackten Bereich der Kapillarsäulen kann das Coating durch Pyrolyse mit heißer, konzentrierter Schwefelsäure entfernt werden. Bei Verwendung einer Glühwendel zur Pyrolyse wird wegen der stärkeren Erwärmung auch das Packungsmaterial thermolysiert. Dieses Verfahren ist daher nur bei Erzeugung eines Detektionsfensters im ungepackten Teil der Kapillarsäulen anzuwenden.

Um Einflüsse durch die externe Bandenverbreiterung auf die Trennstufenhöhe möglichst klein zu halten, wurden die Kapillarsäulen fast ausschließlich im ICD-Modus betrieben [8]. Das Detektionsfenster wurde in diesem Fall nach dem Packen durch Pyrolyse des Coatings mit konzentrierter Schwefelsäure hergestellt. Sollten die Kapillarsäulen im OCD-Modus betrieben werden, wurde ein ungepacktes Stück einer Kapillare mit gleichem I.D. mit einem 2-Komponenten-Kleber auf Kunstharzbasis angeklebt. Die Klebestelle wurde durch Überkleben eines kurzen Stücks einer Kapillare mit einem I.D. von 400 µm stabilisiert. Das Detektionsfenster wurde anschließend mit einer Glühwendel auf dem ungepackten Teil der Kapillare erzeugt.

3.3 Aufbau und Funktion des verwendeten Geräts für isokratische Kapillar-Elektrochromatographie

Entscheidend für den Einsatz der CEC im Routinebetrieb ist ihre Automatisierbarkeit. Grundsätzlich können kommerzielle Geräte für die CE auch für die CEC verwendet werden. Allerdings ermöglichen diese Geräte nicht die Konditionierung der gepackten Kapillarsäulen unter Druck. Dazu muß die Kapillarsäule ausgebaut und mit einer geeigneten Pumpe verbunden werden, was mit einem nicht unerheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden ist. Deshalb ist es in der CEC zweckmäßig, eine Pumpe direkt in den Chromatographen zu integrieren. Ferner sollte die Probenaufgabe durch einen Autosampler erfolgen können. Ein Gerät, das diese Anforderungen erfüllt, ist in [36] beschrieben worden. Es wurde in leicht geänderter Form auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Das CEC-Gerät ist schematisch in Abb. 5 dargestellt. Auf dem aufgabeseitigen Ende der Kapillarsäule entspricht das Gerät im Aufbau einem üblichen CE-Gerät. Die Probenaufgabe erfolgt elektrokinetisch. Nach Austausch des Puffergefäßes mit dem Probengefäß wird an die Kapillarsäule für 1 bis 10 s ein elektrisches Potential von 0 bis + 35 kV angelegt. Spannung und Zeitdauer können an einem Steuergerät vorgewählt werden. Dieser Aufbau gestattet den Einsatz der in der CE üblichen Autosampler.

Am detektorseitigen Ende ist die Kapillarsäule in ein T-Stück aus Edelstahl eingeschraubt. Diese Verschraubung wird durch eine Quetschdichtung abgedichtet. An die verbleibenden Eingänge des T-Stücks sind über PEEK-Kapillaren eine HPLC-Pumpe und eine Spritze angeschlossen. Beide Zuflüsse können über Ventile geschlossen werden. Zum Konditionieren der Kapillarsäule werden beide Ventile geöffnet und die mobile Phase mit der Spritze in das System eingebracht. Nach dem Schließen von Ventil 1 wird die mobile Phase mit der Pumpe bei $p = 50 - 100$ bar durch die Kapillarsäule gedrückt. Das Konditionieren der Kapillarsäule

dauert 30 - 60 min. Anschließend werden beide beide Ventile geöffnet und das Gerät ist betriebsbereit.

Zum Schutz vor der während des Betriebs an dem Probenaufgabegefäß, der Trennkapillare und dem T-Stück anliegenden Hochspannung sind diese Teile in einen Schutzkasten aus Plexiglas eingebaut. Eine Möglichkeit zur Thermostatisierung der Kapillarsäule besteht bei dem vorgestellten Gerät nicht. Als Detektor wurde ein für die CE konstruierter UV/Vis-Detektor verwendet.

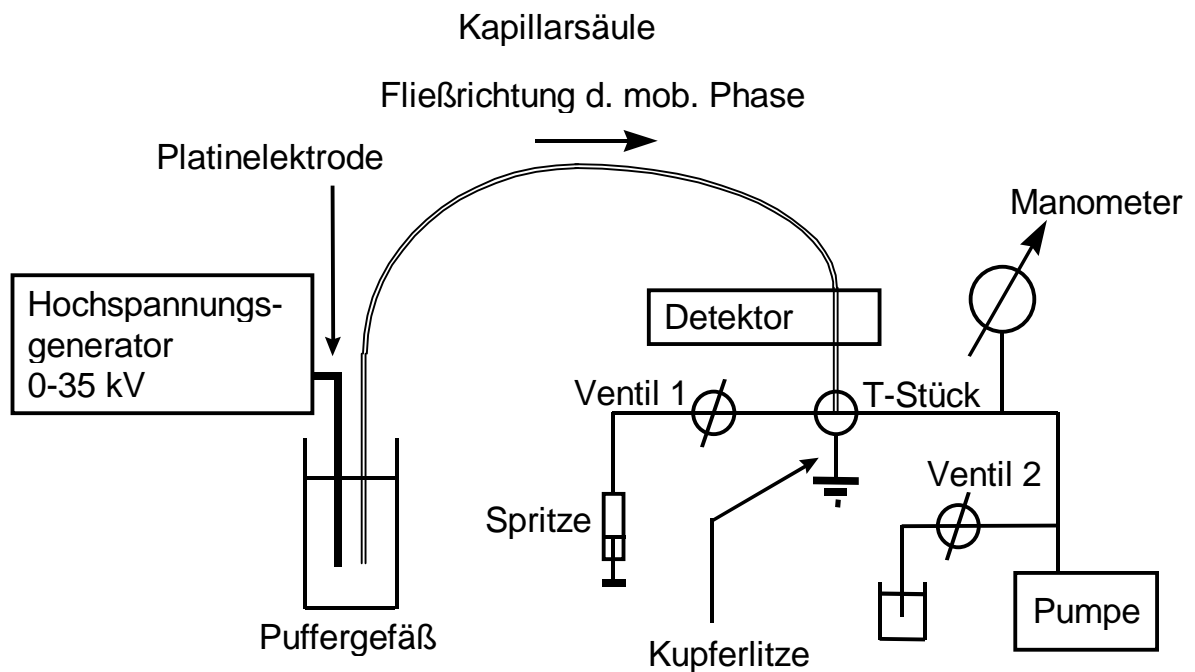


Abb. 5: Schematischer Aufbau des verwendeten Geräts für isokratische CEC

3.4 Angaben zur Zusammensetzung der mobilen Phase

Als mobile Phasen wurden fast ausschließlich Gemische aus AcCN und einer wäßrigen Pufferlösung verwendet. Der Volumenanteil des AcCN an der mobilen Phase betrug 50 - 80 % v/v. Die wäßrige Pufferlösung enthielt NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Die Phosphatkonzentration ($c(\text{NaH}_2\text{PO}_4) + c(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$) betrug meist 1 mmol/L. Der pH-Wert einer solchen Lösung beträgt 7,2. Diese Mischung wird im folgenden als Phosphatpuffer bezeichnet. Auf eine abweichende Zusammensetzung der mobilen Phase wird im Text an entsprechender Stelle hingewiesen.

AcCN wurde vor Gebrauch destilliert. Wasser wurde doppelt destilliert. Nach dem Mischen des AcCN mit der Pufferlösung wurde die mobile Phase durch Behandeln mit Ultraschall entgast. Für die Gradienten-CEC wurde die mobile Phase durch Behandeln mit Ultraschall im Wasserstrahlpumpen-Vakuum entgast.

3.5 Meßwertaufnahme und Auswertung

Zur Meßwertaufnahme wurden ein A/D-Wandler (SS 240, Scientific Software) und ein PC benutzt. Die Chromatogramme wurden mit dem Programm EZChrom (Scientific Software) aufgenommen und ausgewertet. Der A/D-Wandler kann Signale mit einer Intensität von 0 – 1 V bzw. 0 – 10 V bei einer Frequenz von 10 – 60 Hz digitalisieren. Ferner ist der A/D-Wandler mit digitalen Anschlüssen versehen, die das Ansteuern externer Geräte durch die Software sowie den Start der Meßwertaufnahme durch eine geeignete Triggerschaltung, z.B. beim Anschalten der Trennungsspannung, ermöglichen.

4 Photometrische Detektion in der Kapillar-Elektrochromatographie

4.1 Einführung

Die häufigsten Detektionsmethoden in der CEC sind die Photometrie und die Fluorimetrie. Als Detektionszelle dient in beiden Fällen ein Teil der Kapillarsäule selbst. Dies ist notwendig, da bei einer Kopplung der Kapillarsäule mit einer separaten Detektionszelle eine Erhöhung der instrumentellen Bandenverbreiterung nicht vermeidbar ist. Aufgrund des kleinen Detektionsvolumens bei einer Detektion in der Kapillarsäule werden in der CEC die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen gegenüber der HPLC erhöht. Deshalb ist es sinnvoll, Kapillarsäulen mit einem möglichst großen I.D. einzusetzen. In der CEC ist der Einsatz von Kapillarsäulen mit einem I.D. von bis zu 320 μm möglich [37].

Für photometrische und fluorimetrische Detektion sind in der CEC grundsätzlich zwei Detektionsmodi, In-column-Detektion (ICD) und On-column-Detektion (OCD), denkbar (Abb. 3, S. 15). Bei ICD wird im gepackten Teil der Kapillarsäule, bei OCD im ungepackten Teil der Kapillarsäule hinter der chromatographischen Trennstrecke detektiert. Da bei ICD keine Abschlußfritte innerhalb der Kapillare erzeugt werden muß, bzw. an eine vollständig gepackte Kapillarsäule kein ungepacktes Kapillarstück gekoppelt werden muß, ist dieser Detektionsmodus apparativ leichter zugänglich. Ferner ist bei ICD der Beitrag der Detektion zur instrumentellen Bandenverbreiterung kleiner als bei OCD, da die Analytzone nur eine Fritte passieren muß [8].

Bei ICD darf das Packungsmaterial nicht absorbieren. Diese Forderung erfüllt RP-Silikagel für einen Wellenlängenbereich von 210-800 nm. Allerdings kommt es zu Intensitätsverlusten infolge Streuung des eingestrahnten Lichts an den Packungsteilchen. Deshalb sind einer Erhöhung des Kapillar-I.D. bei ICD Grenzen gesetzt. Die Lichtstreuung ist um so stärker je verschiedener die Brechungsindices n_D der mobilen und der stationären

Phase sind. Deshalb ist bei ICD nicht der Einsatz jeder beliebigen mobilen Phase möglich. Die Anwendung von ICD ist daher eingeschränkt.

Bei ICD wird bei verschiedenen Methoden, die Kapillarsäulen zur Stofftrennung einsetzen, gegenüber OCD eine Signalverstärkung für retardierte Analyte sowohl bei fluorimetrischer [20, 38] als auch photometrischer Detektion [39] beobachtet. Die vorliegende Arbeit vergleicht für die photometrische Detektion in der CEC ICD und OCD im Hinblick auf die Signalverstärkung. Die Abhängigkeit der Linearität der Kalibrierfunktion vom Detektionsmodus wird ebenso untersucht, wie dessen Einfluß auf die Nachweisgrenze (LOD) und die erreichbare Wiederholpräzision.

4.2 Signalverstärkung bei In-column-Detektion

Im gepackten Teil der Kapillarsäule wird die mobile Phase durch die stationäre Phase verdrängt. Daher nimmt eine Analytzone im gepackten Teil ein größeres Volumen als im ungepackten Teil ein. Beim Verlassen der Packung wird die Analytzone um einen bestimmten Faktor fokussiert, da der Volumenfluß durch den gepackten und den ungepackten Teil konstant ist. Dieser Faktor ist gleich dem Volumenanteil φ_M der mobilen Phase in der Packung am Gesamtvolumen. Der Wert von φ_M beträgt nach [40] ca. 0,7. Im folgenden wird stets mit $\varphi_M = 0,7$ gerechnet. Durch die Fokussierung der Analytzone wird die Masse des Analyten pro Volumensegment der Kapillarsäule im ungepackten Teil gegenüber der Masse pro Volumensegment im gepackten Teil um $1/\varphi_M$ erhöht.

Ein Analyt mit $k > 0$ wird auf der stationären Phase angereichert. Verläßt die Analytzone den gepackten Teil der Kapillarsäule, wird der Anreicherungsprozeß umgekehrt. Durch die Umkehrung des Anreicherungsprozesses nimmt die Masse des Analyten pro Volumensegment der Kapillarsäule im ungepackten Teil gegenüber der Masse pro Volumensegment im gepackten Teil um einen Faktor $(1+k)$ ab.

Diese beiden Effekte führen in Anlehnung an Überlegungen von GUTHRIE und JORGENSEN [38] zu Gl. 11:

$$S_I/S_O = \varphi_M \cdot (1+k) \quad (11)$$

S_I/S_O : Signalverstärkung bei ICD gegenüber OCD

Nach Gl. 11 wird das detektierte Signal bei ICD gegenüber dem Signal bei OCD unter ansonsten gleichen Bedingungen um einen Faktor $(1+k)\varphi_M$ verstärkt. Das Signal kann dabei sowohl die Peakfläche als auch die Peakhöhe sein. Bei ICD ist aufgrund der Anreicherung des Analyten in der stationären Phase die Länge der Analytzone gegenüber OCD um einen Faktor $(1+k)$ verkürzt. GUTHRIE und JORGENSEN [38] haben gezeigt, daß die räumliche Auflösung für einen In-column-Detektor bei Verwendung von offenen Filmkapillaren um einen Faktor $(1+k)$ besser sein muß als für den entsprechenden On-column-Detektor, um einen konstanten Beitrag der Detektion zur Bandenverbreiterung außerhalb der Säule zu gewährleisten. Beim Einsatz gepackter Kapillarsäulen muß der Verdrängungseffekt durch die stationäre Phase berücksichtigt werden. Folglich muß bei gepackten Kapillarsäulen die räumliche Auflösung des Detektors bei ICD gegenüber OCD um einen Faktor $(1+k)/\varphi_M$ verbessert werden [20].

4.3 Experimentelle Überprüfung der vorhergesagten Signalverstärkung

Für fluorimetrische Detektion konnte die Gültigkeit von Gl. 11 gezeigt werden [20]. CHEN und HORVÁTH fanden für die μ -HPLC bei Einsatz der Photometrie einen anderen Zusammenhang für die Signalverstärkung bei ICD gegenüber OCD [39]. Für die Überprüfung der Gültigkeit von Gl. 11 bei photometrischer Detektion wurde in der vorliegenden Arbeit dieselbe Kapillarsäule für ICD und OCD verwendet. Dazu wurde zunächst eine

Kapillarsäule für OCD, wie in Abschnitt 3.2.4, S. 20 beschrieben, hergestellt. Nach den Messungen im OCD-Modus wurde der ungepackte Teil der Kapillarsäule abgeschnitten und dieselben Messungen im ICD-Modus wiederholt. Um für ICD und OCD dieselbe Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase zu erhalten, wurde die Trennspannung U der kleineren Kapillarlänge bei ICD angepaßt. Auch die Probeaufgabeparameter (Aufgabespannung und -zeit) wurden bei ICD gegenüber OCD so variiert, daß stets dasselbe Probenvolumen aufgegeben wurde. Es wurden Kalibrierfunktionen für mehrere Benzoessäureester aufgenommen. Dazu wurden im Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 g/L bei 9 verschiedenen Konzentrationen Messungen durchgeführt. Als interner Standard wurde Benzoesäuremethylester, $c = 1$ g/L verwendet. Der Standard diente zur Normalisierung der Peakflächen. Dabei wurde berücksichtigt, daß das Signal des Standards bei ICD selbst verstärkt wird ($k = 0,52$, $S_I/S_O = 1,06$ nach Gl. 11). Die Verwendung eines internen Standards war notwendig, da das Detektionsfenster der Kapillarsäule nicht reproduzierbar im Strahlengang des Detektors zu plazieren war.

Zur Auswertung wurden die nach Gl. 11 aus den gemessenen Werten für k berechneten Signalverstärkungen S_I/S_O mit den experimentell erhaltenen Werten verglichen. Dazu wurden die Verhältnisse der auf den internen Standard normierten Peakflächen $A_{n,I}/A_{n,O}$ für jede Konzentration gebildet ($A_{n,I}$ = normierte Peakfläche bei ICD, $A_{n,O}$ = normierte Peakfläche bei OCD), und die Quotienten der Steigungen der Kalibriergeraden für ICD und OCD m_I/m_O (m_I = Steigung bei ICD, m_O = Steigung bei OCD) berechnet. Beide Größen entsprechen S_I/S_O .

Abb. 6 zeigt je ein Chromatogramm für ICD und OCD. Die Konzentration der Analyte beträgt in beiden Fällen $c = 0,8$ g/L. Die Chromatogramme zeigen, daß bei ICD die relative Intensität nachfolgend eluierter Peaks gegenüber OCD in Bezug auf den internen Standard Benzoesäuremethylester erhöht ist. Dabei wächst die Signalverstärkung bei ICD gegenüber OCD mit steigendem Wert für k .

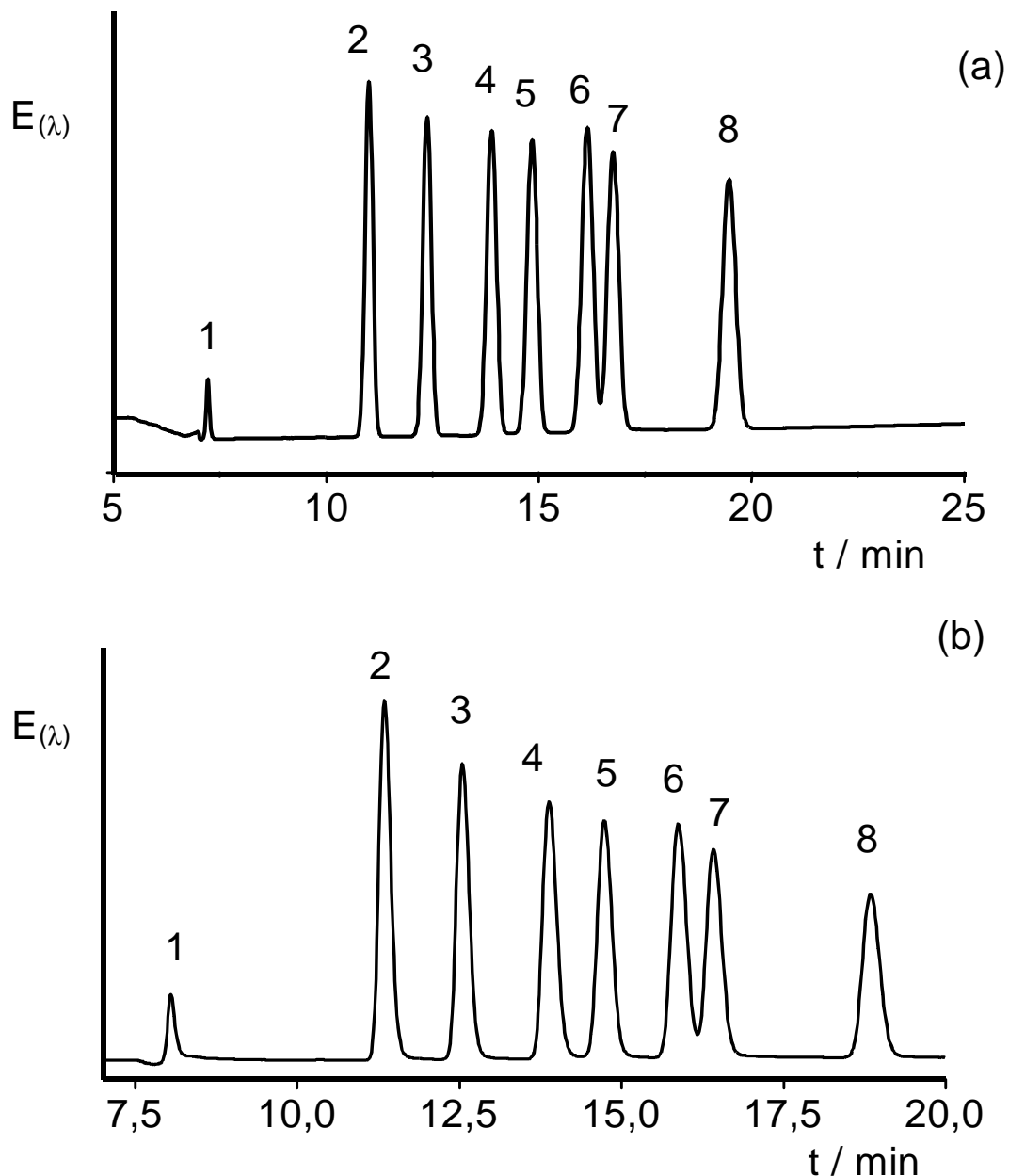


Abb 6: Vergleich zweier Chromatogramme für (a) ICD und (b) OCD. (a) Kapillarsäule, $L = 325(270) \text{ mm} \times 180 \text{ } \mu\text{m}$ I.D., Trennungsspannung 12,2 kV, elektrokin. Probenaufgabe, 8,1 kV für 5 s, (b) Kapillare, $L = 400(350) \text{ mm} \times 180 \text{ } \mu\text{m}$ I.D., Trennungsspannung 15 kV, elektrokin. Probenaufgabe, 10 kV für 5 s, stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \text{ } \mu\text{m}$, mobile Phase AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v, Analyte, 1 = Thioharnstoff, 2 = Benzoessäuremethylester ($c = 1 \text{ g/L}$), 3 = Benzoessäureethylester, 4 = Benzoessäurephenylester, 5 = Benzoessäurebenzylester, 6 = Benzoessäure-*p*-tolylester, 7 = Benzoessäurebutylester, 8 = Benzoessäure-*i*-pentylester ($c(3-8) = 0,8 \text{ g/L}$), $\lambda = 230 \text{ nm}$.

In Tab. 1 sind die nach Gl. 11 vorhergesagten Signalverstärkungen und die aus den normierten Peakflächen für $c = 0,8 \text{ g/L}$ berechneten Signalverstärkungen aufgelistet. Die Tabelle enthält auch die aus dem Verhältnis der Steigungen der Kalibriergeraden berechneten Signalverstärkungen.

Tab. 1 kann entnommen werden, daß die vorhergesagten Signalverstärkungen mit den experimentell bestimmten Signalverstärkungen sehr gut übereinstimmen. Gl. 11 ist demnach auch für die photometrische Detektion in der CEC gültig. Tab. 1 enthält die aus den normierten Peakflächen berechneten Signalverstärkungen nur für $c = 0,8 \text{ g/L}$. Für die übrigen Konzentrationen stimmen die aus den normierten Peakflächen bestimmten Signalverstärkungen mit denen, die nach Gl. 11 berechnet wurden, ebenfalls gut überein. Diese Daten werden hier nicht aufgelistet.

Tab 1: Vergleich zwischen vorhergesagten und experimentell bestimmten Signalverstärkungen

Analyt	k	S_I/S_O	$A_{n,I}/A_{n,O}$	m_I/m_O
Benzoessäureethylester	0,72	1,20	1,20	1,19
Benzoessäurephenylester	0,93	1,35	1,36	1,35
Benzoessäurebenzylester	1,06	1,44	1,45	1,42
Benzoessäure- <i>p</i> -tolylester	1,24	1,57	1,57	1,56
Benzoessäurebutylester	1,32	1,62	1,61	1,62
Benzoessäure- <i>i</i> -pentylester	1,70	1,89	1,90	1,91

S_I/S_O = vorhergesagte Signalverstärkung nach Gl. 11, $A_{n,I}/A_{n,O}$ = Signalverstärkung, berechnet aus den normierten Peakflächen für $c = 0,8 \text{ g/L}$, m_I/m_O = Signalverstärkung, berechnet aus den Steigungen der Kalibrierfunktionen bei ICD und OCD, experimentelle Bedingungen siehe Abb. 6

4.4 Abhängigkeit der Linearität der Kalibrierfunktion vom Detektionsmodus

Für OCD können in der CEC mit gepackten Kapillarsäulen, ähnlich wie in der MEKC und der CE, bei denen auch in der Kapillare detektiert wird, über große Konzentrationsbereiche lineare Kalibrierfunktionen erwartet werden. Es kann davon ausgegangen werden, daß bei ICD der Verlauf der Kalibrierfunktion durch den Detektionsmodus beeinflusst wird. Zu dieser Beeinflussung kann es durch den verstärkten Einfall von Streulicht auf den Photomultiplier des Detektors bei ICD kommen. Das eingestrahelte Licht wird in beiden Detektionsmodi an den gekrümmten Innen- und Außenflächen der Kapillare gestreut. Haben mobile und stationäre Phase sehr verschieden starke Brechungsindices n_D , kommt es bei ICD auch zur Streuung des eingestrahelten Lichts an den Packungsteilchen. Da n_D der mobilen Phase mit deren Zusammensetzung verändert wird, kann der Linearitätsbereich der Kalibrierfunktion bei ICD von der Zusammensetzung der mobilen Phase beeinflusst werden.

Inwieweit der AcCN-Gehalt mobiler Phasen aus diesem Lösungsmittel und einer wäßrigen Pufferlösung den Verlauf der Kalibrierfunktion bei ICD beeinflusst, wurde mit folgendem Experiment überprüft. Für drei mobile Phasen mit einem Volumenanteil φ von 60 - 80 % AcCN wurden für drei Benzoessäureester Kalibrierfunktionen im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1 g/L aufgenommen. Dazu wurden Chromatogramme der Ester bei 8 verschiedenen Konzentrationen entwickelt. Bei ICD mit $\varphi(\text{AcCN}) = 80\%$ wurden 7 verschiedene Konzentrationen vermessen. Für OCD wurde nur eine Messung für $\varphi(\text{AcCN}) = 80\%$ aufgenommen, da hier von keiner Beeinflussung des Linearitätsbereichs der Kalibrierfunktion von der Zusammensetzung der mobilen Phase ausgegangen werden kann. Als interner Standard wurde Benzoessäuremethylester, $c = 1 \text{ g/L}$, verwendet. Die Messungen wurden gemäß Abschnitt 4.3 ausgeführt.

In Abb. 7 sind die bei OCD und ICD erhaltenen Kalibrierfunktionen von Benzoessäurebutylester für die verwendeten mobilen Phasen dargestellt. Alle Kalibrierfunktionen sind linear. Aufgrund der Signalverstärkung ist die Steigung der Kalibrierfunktion für $\phi(\text{AcCN}) = 80\%$ bei ICD größer als bei OCD. Dies bedeutet eine Steigerung der Empfindlichkeit. Da k der betrachteten Analyte bei Verringerung von $\phi(\text{AcCN})$ steigt, steigt auch die Signalintensität bei ICD. Infolgedessen wird die Steigung der Kalibrierfunktion durch Erhöhung des Wassergehalts der mobilen Phase vergrößert und damit die Empfindlichkeit verbessert.

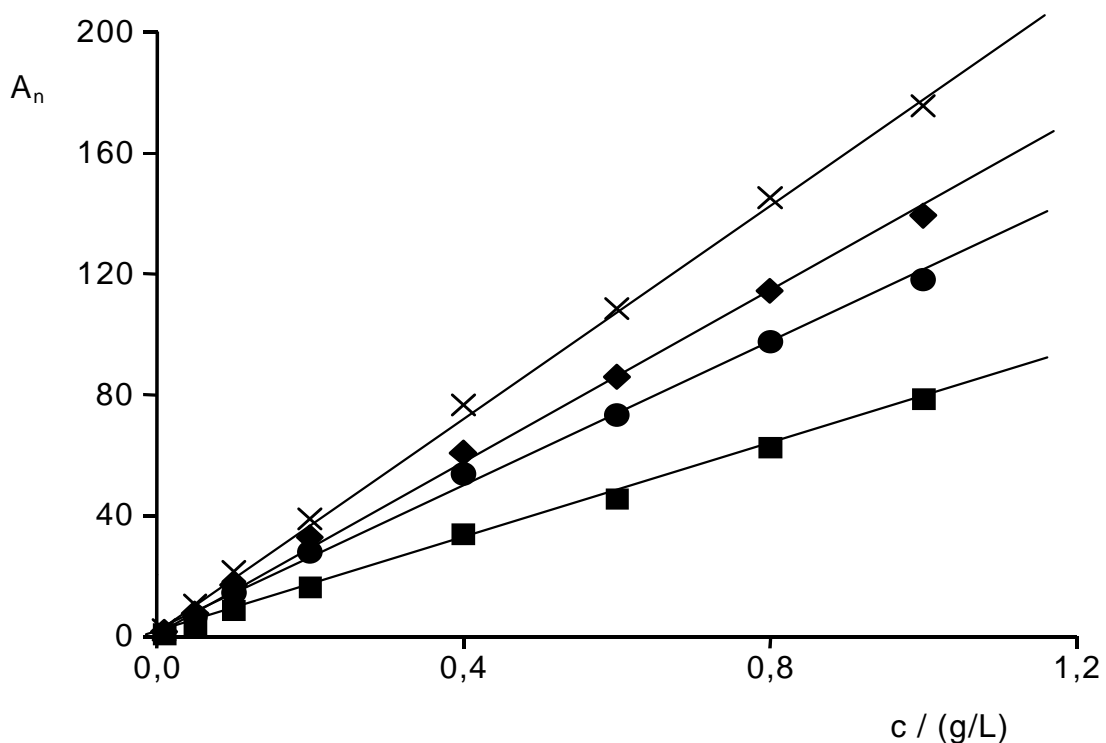


Abb. 7: Kalibrierfunktionen für Benzoessäurebutylester bei OCD und ICD. OCD: ■ = AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v, ICD: ● = AcCN/Phosphatpuffer 8:2, ◆ = 7:3, X = 6:4, v/v; Meßbedingungen: OCD: Kapillare, 490(339) mm \times 180 μ m I.D., Trennungsspannung 25 kV, elektrokin. Probenaufgabe, 11 kV für 5 s; ICD: Kapillare, 390(330) mm \times 180 μ m I.D., Trennungsspannung 20 kV, elektrokin. Probenaufgabe, 10 kV für 5 s; stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \mu$ m, $\lambda = 230$ nm

Tab. 2 vergleicht die nach Gl. 11 berechneten Signalverstärkungen bei wechselnder Zusammensetzung der mobilen Phase mit den experimentell bestimmten Werten. Die experimentell bestimmten Werte für die Signalverstärkungen wurden aus den Steigungen der Kalibrierfunktionen berechnet. Die nach Gl. 11 berechneten Signalverstärkungen stimmen mit den experimentell bestimmten Werten gut überein.

Tab. 2: Vergleich der berechneten Signalverstärkung S_I/S_O mit der experimentell bestimmten Signalverstärkung m_I/m_O bei wechselnder Zusammensetzung der mobilen Phase

$\varphi(\text{AcCN})$	Analyt	k	S_I/S_O	m_I/m_O
80	Benzoessäureethylester	0,76	1,23	1,22
80	Benzoessäurepropylester	1,03	1,43	1,40
80	Benzoessäurebutylester	1,41	1,69	1,64
70	Benzoessäureethylester	1,26	1,58	1,56
70	Benzoessäurepropylester	1,80	1,96	1,90
70	Benzoessäurebutylester	2,56	2,49	2,36
60	Benzoessäureethylester	2,10	2,17	2,13
60	Benzoessäurepropylester	3,16	2,91	2,81
60	Benzoessäurebutylester	4,77	4,04	3,81

Meßbedingungen: mobile Phase AcCN/Phosphatpuffer [$\varphi(\text{AcCN}):(100-\varphi(\text{AcCN}))$], v/v, sonstige Bedingungen siehe Abb. 7

S_I/S_O = Signalverstärkung, berechnet nach Gl 11, m_I/m_O = Signalverstärkung, berechnet aus den Steigungen der Kalibrierfunktion für ICD und OCD

Um ihre Linearität zu verifizieren, wurde für jede Kalibrierfunktion ein Anpassungstest nach MANDEL vorgenommen (F-Test, Signifikanzniveau 99 %). Mit dem Test wurde geprüft, ob sich die erhaltenen Meßwerte $A_{n,I}$ und $A_{n,O}$ als Funktion der Konzentration durch ein Polynom 2. Ordnung (gekrümmte Kalibrierfunktion) signifikant besser als durch eine Gerade beschreiben lassen.

In Tab. 3 werden die berechneten F–Werte, F_{ber} , mit den tabellierten F–Werten, F_{tab} , für die Kalibrierfunktion von Benzoessäurebutylester verglichen. Die Tabelle zeigt, daß der Anpassungstest nach MANDEL unabhängig vom Detektionsmodus und der Zusammensetzung der mobilen Phase keine signifikante Abweichung der Kalibrierfunktion von der Linearität ergibt. Für die Kalibrierfunktionen der übrigen Benzoessäureester wurde ein vergleichbares Ergebnis erhalten. Diese Ergebnisse werden hier nicht gezeigt.

Tab. 3: F-Test für die Kalibrierfunktion für Benzoessäurebutylester bei OCD und ICD mit wechselnder Zusammensetzung der mobilen Phase (Signifikanzniveau 99 %)

OCD, $\phi(\text{AcCN})$ /%	n	r^2	F_{ber}	F_{tab}
80	8	0,9986	0,133	16,26
ICD, $\phi(\text{AcCN})$ /%	n	r^2	F_{ber}	F_{tab}
80	7	0,9975	7,85	21,20
70	8	0,9985	10,62	16,26
60	8	0,9989	15,37	16,26

F_{tab} = tabellierter F-Wert, F_{ber} = berechneter F-Wert, r^2 = Quadrat des Regressionskoeffizienten, n = Anzahl der Meßpunkte

Meßbedingungen siehe Tab. 2

Unter den gewählten Bedingungen wird die Linearität der Kalibrierfunktion nicht von der Wahl des Detektionsmodus beeinflusst. Unter den hier gewählten Bedingungen kann also in beiden Detektionsmodi mit linearen Kalibrierfunktionen gearbeitet werden.

4.5 Einfluß des Detektionsmodus auf die Nachweisgrenze

Als Nachweisgrenze (LOD) wird in der Analytischen Chemie meist das 3σ - Kriterium angewandt. Dieses Kriterium bezeichnet die Konzentration eines Analyten als Nachweisgrenze eines Verfahrens, die ein Signal erzeugt, das dreimal höher als das Rauschen des Hintergrunds ist. In der Flüssigkeitschromatographie ist der Hintergrund die Basislinie des Chromatogramms. In den folgenden Betrachtungen wurde die Nachweisgrenze gemäß dem 3σ - Kriterium aus der Steigung der Kalibriergeraden und dem graphisch ermittelten Rauschen berechnet.

Das Rauschen wurde für beide Detektionsmodi bestimmt, indem ein Teil der Grundlinie vergrößert ausgedruckt wurde, und zueinander parallele Geraden an die maximalen Amplituden der Grundlinie angelegt wurden. Der Abstand zwischen den Geraden wurde als Schätzwert für das Rauschen in den Berechnungen von LOD verwendet. Dieser Wert ist größer als σ für ein normalverteiltes Hintergrundsignal.

Bei ICD wird ein Teil des eingestrahnten Lichts nicht nur an der Kapillarin- und Kapillaraußenwand, sondern auch am Packungsmaterial gestreut. Es wird angenommen, daß dieses Streulicht das Rauschen der Basislinie erhöht. Da das Rauschen bei ICD größer ist als bei OCD, muß in der CEC die Nachweisgrenze abhängig vom Detektionsmodus sein. Abb. 8 veranschaulicht dies am Chromatogramm von Benzoesäurepropylester ($c = 0,05 \text{ g/L}$) bei ICD und OCD unter ansonsten gleichen Bedingungen. Am schlechteren Signal/Rauschverhältnis S/R erkennt man, daß bei ICD das Rauschen der Basislinie gegenüber OCD stärker ist.

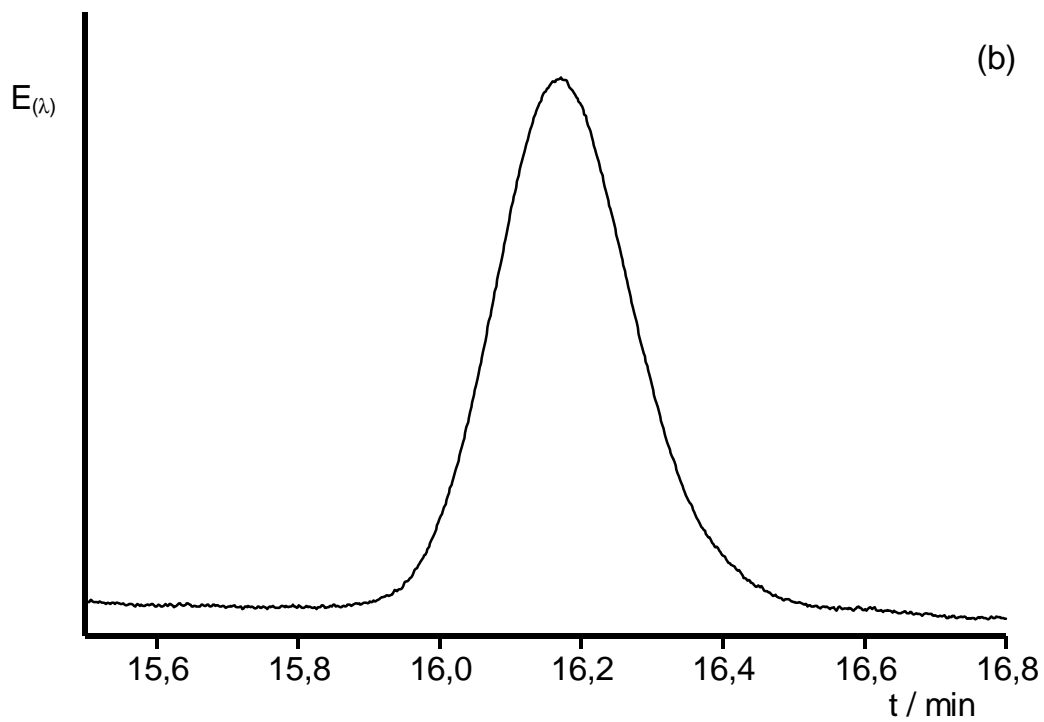
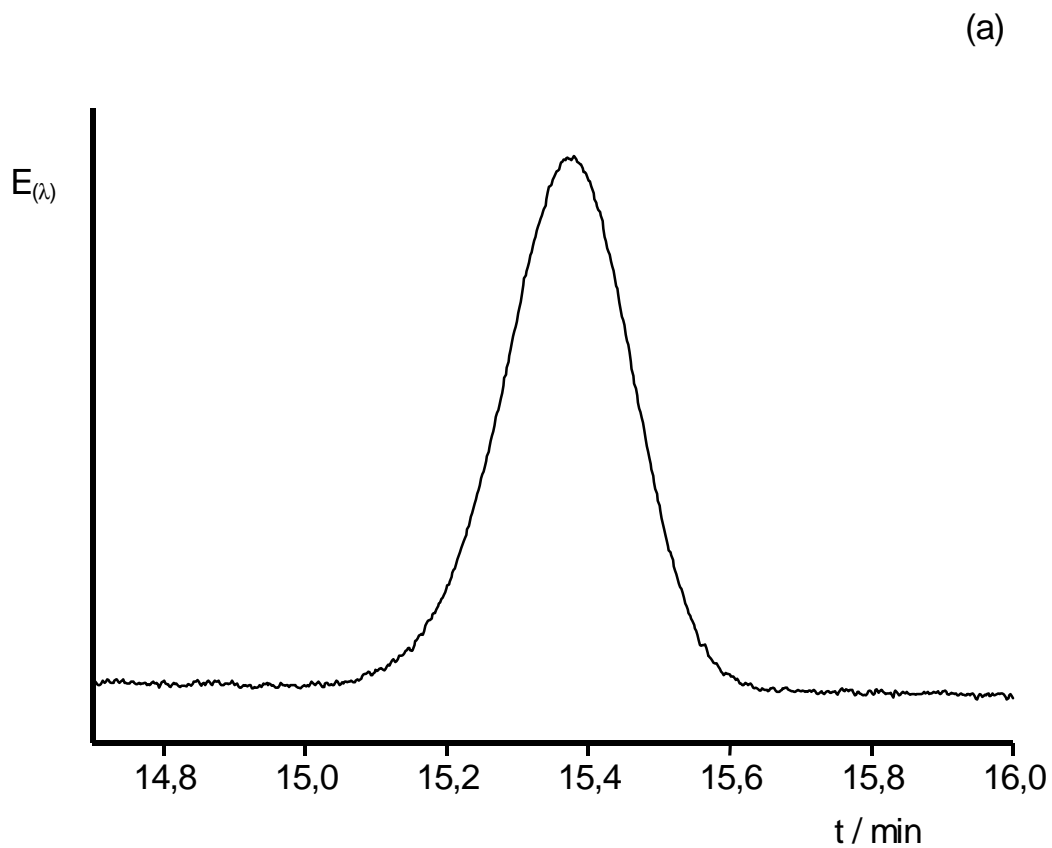


Abb 8: Aufgezeichnete Signale für Benzoessäurepropylester (beide $c = 0,05$ g/L) bei (a) ICD und (b) OCD unter ansonsten gleichen Bedingungen. Meßbedingungen siehe Abb. 6

Im vorliegenden Fall ist das Rauschen bei ICD um einen Faktor 2 höher als bei OCD. Eine Verstärkung des Rauschens bei ICD um einen Faktor 2 wurde auch bei fluorimetrischer Detektion in der CEC [20] und photometrischer Detektion in der μ -HPLC [39] beschrieben.

Ist die Nachweisgrenze für OCD, $LOD(OCD)$, bekannt, kann die Nachweisgrenze für ICD, $LOD(ICD)$, nach Gl. 12 berechnet werden.

$$LOD(ICD) = \frac{LOD(OCD) \cdot F(R)}{(1 + k) \cdot \phi_M} \quad (12)$$

Darin ist $F(R)$ der Rauschfaktor, um den das Rauschen bei ICD gegenüber OCD erhöht ist. Im vorliegenden Fall ist $F(R) = 2$.

In Tab. 4 sind für 3 Benzoesäureester die experimentell bestimmten Werte für $LOD(OCD)$ und $LOD(ICD)$ aufgeführt. Die Nachweisgrenzen wurden aus den Kalibrierfunktionen der Analyte ($c = 0,01 - 1 \text{ g/L}$) aus Abschnitt 4.4 für $\phi(AcCN) = 80 \%$ unter Zugrundelegung des 3σ - Kriteriums bestimmt.

Für alle Analyte ist $LOD(OCD)$ kleiner als $LOD(ICD)$. Aufgrund des stärkeren Rauschens bei ICD ist dieses Ergebnis zu erwarten. Allerdings steigt für OCD LOD mit steigendem Wert für k des Analyten stärker an als für ICD. Verläßt ein Analyt mit $k > 0$ die chromatographische Trennstrecke, wird der Anreicherungsprozeß des Analyten in der stationären Phase umgekehrt. Die Probenzone wird verbreitert und die Masse des Analyten pro Volumensegment der Kapillarsäule nimmt ab (General elution problem [39]). Dadurch wird das Signal des Analyten verbreitert und die Intensität des Signals nimmt ab. Der Effekt wächst mit dem Retentionsfaktor des Analyten. Bei ICD wird vor der Elution von dem chromatographischen Bett gemessen, d.h. die für OCD beschriebene Signalabnahme mit steigendem Retentionsfaktor ist bei ICD nicht zu beobachten.

Tab. 4 enthält auch die nach Gl. 12 aus LOD(OCD) berechneten Werte für LOD(ICD). Als Rauschfaktor wurde der oben experimentell bestimmte Wert $F(R) = 2$ eingesetzt. Die berechneten Werte für LOD(ICD) stimmen mit den experimentell bestimmten Werten gut überein.

Nach Gl. 12 wird erwartet, daß für Analyte mit $k > 1,86$ LOD(ICD) für $F(R) = 2$ kleiner als LOD(OCD) wird. Obwohl in das Experiment kein Analyt mit $k > 1,86$ einbezogen wurde, läßt die Übereinstimmung der experimentell bestimmten Werte für LOD(ICD) mit den nach Gl. 12 berechneten Werten in Tab. 4 den Schluß zu, daß für Analyte mit Werten für $k > 2$ LOD(ICD) gegenüber LOD(OCD) verbessert wird. Der Einsatz von ICD kann also bei einem gegebenen Verfahren in der CEC gegenüber OCD zu einer Verbesserung der Nachweisgrenze führen.

Tab. 4: Nachweisgrenzen (LOD) für Benzoessäureester in Abhängigkeit vom Detektionsmodus

Analyt	k	LOD(OCD)/ (mg/L)	LOD(ICD)/ (mg/L) ^{a)}	LOD(ICD)/ (mg/L) ^{b)}
Benzoessäure- ethylester	0,76	1,1	1,8	1,8
Benzoessäure- propylester	1,03	1,4	1,9	2,0
Benzoessäure- butylester	1,41	1,8	2,1	2,1

^{a)} experimentell bestimmt, ^{b)} berechnet nach Gl. 12 ($F(R) = 2$).

Mobile Phase AcCN/Phosphatpuffer 8:2 v/v, sonstige Bedingungen siehe Tab. 2

4.6 Wiederholpräzision

In den Tab. 5 und 6 werden die relativen Standardabweichungen (RSD) als Maß für die Wiederholpräzision der Retentionszeiten t_r und der normierten Peakflächen A_n verglichen. Die Messungen wurden, wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, mit derselben Kapillare und auch unter ansonsten gleichen Bedingungen ausgeführt. Als Analyte wurden Benzoessäureester ($c = 0,25$ g/L) verwendet. Als interner Standard diente Benzoessäuremethylester, $c = 1$ g/L. Es wurden pro Detektionsmodus 10 aufeinanderfolgende Messungen ausgeführt.

Für alle Analyte ist die Wiederholpräzision von A_n für OCD besser als für ICD, obwohl $RSD(t_r)$ für die mit ICD ausgeführten Messungen kleiner war als $RSD(t_r)$ für die mit OCD aufgenommenen Chromatogramme. Eine Normalisierung von A_n auf t_r ändert nichts an diesem Ergebnis. Die schlechtere Wiederholpräzision für die Peakflächen bei ICD in der Bestimmung von A_n muß andere Ursachen als Schwankungen bei den Retentionszeiten der Analyte haben.

Eine mögliche Ursache für die größere Ungenauigkeit der Bestimmung von A_n bei ICD ist das stärkere Rauschen der Basislinie in diesem Detektionsmodus. Nach Gl. 12 sollte für Benzoessäure-*i*-pentylester ($k = 1,7$) mit $F(R) = 2 \text{ LOD(OCD)}$ vergleichbar mit LOD(ICD) sein und damit die Wiederholpräzision vom Detektionsmodus unabhängig sein. Tatsächlich ist die relative Standardabweichung von A_n für diesen Analyten bei ICD am höchsten. Das Rauschen der Basislinie als einzige Ursache der größeren Ungenauigkeit der quantitativen Bestimmung bei ICD ist damit unwahrscheinlich.

Tab. 5: Wiederholpräzision der Bestimmung von Benzoessäureestern bei OCD

Analyt	k	RSD(t_r) /%	RSD(A_n) /%
Benzoessäureethylester	0,72	1,42	0,75
Benzoessäurephenylester	0,93	1,42	1,25
Benzoessäurebenzylester	1,06	1,42	1,28
Benzoessäure- <i>p</i> -tolylester	1,24	2,37	0,98
Benzoessäurebutylester	1,32	1,43	0,98
Benzoessäure- <i>i</i> -pentylester	1,70	1,46	0,93

Interner Standard Benzoessäuremethylester, $c = 1\text{g/L}$, $n = 10$, Meßbedingungen: Kapillarsäule, $L = 455(403)\text{ mm} \times 180\text{ }\mu\text{m}$ I.D., stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3\text{ }\mu\text{m}$, mobile Phase, AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v, Trennungsspannung 20 kV, elektrokin. Probenaufgabe, 12 kV für 5s, Analytkonzentration $c = 0,25\text{ g/L}$, $\lambda = 230\text{ nm}$

Tab. 6: Wiederholpräzision der Bestimmung von Benzoessäureestern bei ICD

Analyt	k	RSD(t_r) /%	RSD(A_n) /%
Benzoessäureethylester	0,72	0,80	0,82
Benzoessäurephenylester	0,93	0,85	2,50
Benzoessäurebenzylester	1,06	0,85	1,79
Benzoessäure- <i>p</i> -tolylester	1,24	0,91	2,32
Benzoessäurebutylester	1,32	0,90	2,34
Benzoessäure- <i>i</i> -pentylester	1,70	0,95	2,83

Interner Standard Benzoessäuremethylester, $c = 1\text{g/L}$, $n = 10$, Meßbedingungen: Kapillarsäule, $L = 377(320)\text{ mm} \times 180\text{ }\mu\text{m}$ I.D., stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3\text{ }\mu\text{m}$, mobile Phase, AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v Trennungsspannung, 16,6 kV, elektrokin. Probenaufgabe, 10 kV für 5s, Analytkonzentration $c = 0,25\text{ g/L}$, $\lambda = 230\text{ nm}$

REBSCHER und PYELL [20] fanden bei ICD in der Fluorimetrie neben dem Basislinienrauschen eine weitere Form des Rauschens, das sie Signalauschen nannten. Dieses Rauschen tritt nur bei ICD beim Durchtritt einer Analytzone durch den Detektor auf. Es ist proportional zur Intensität des detektierten Signals. Damit beeinflusst das Signalauschen nicht die Nachweisgrenze, wohl aber die Wiederholpräzision eines Verfahrens. Im vorliegenden Fall ist $RSD(A_n)$ für später eluierte Analyte bei ICD höher als bei OCD. Deren Signale werden am meisten durch die beobachtete Signalverstärkung erhöht. Dies legt den Schluß nahe, daß auch bei der Photometrie das Signalauschen neben dem Basislinienrauschen verantwortlich für die Verschlechterung der Wiederholpräzision bei ICD ist. Als Ursache für das Signalauschen kommt die Wanderung von Packungsteilchen durch das angelegte elektrische Feld in Betracht. Dies wird durch die niedrige Frequenz des Signalauschens belegt. In monolithischen Kapillarsäulen dürfte es nicht beobachtbar sein.

5 Optimierung der Probenaufgabe

5.1 Elektrokinetische Probenaufgabe

In der CEC erfolgt die Probenaufgabe meist elektrokinetisch. Dazu wird das Puffergefäß am aufgabeseitigem Ende der Kapillarsäule durch ein Gefäß, das die Analytlösung enthält, ausgetauscht. Anschließend wird für eine bestimmte Zeitdauer eine Spannung angelegt. Der sich einstellende EOF befördert die Probe auf den Säulenkopf. Die Länge L_I der aufgegebenen Probenzone ist proportional zur angelegten Aufgabespannung U_I , der Aufgabezeit t_I und der elektroosmotischen Beweglichkeit μ_{eo} des Phasensystems aus mobiler und stationärer Phase. Für nicht retardierte Analyte läßt sich L_I nach Gl. 13 berechnen.

$$L_I = t_I \cdot \mu_{eo} \cdot U_I \cdot L_G^{-1} \quad (13)$$

L_G = Gesamtlänge der Kapillare

Wird ein Analyt bereits während der Probenaufgabe retardiert, ist dies in Gl. 13 zu berücksichtigen. Man erhält Gl. 14. Darin ist k_{LP} der Retentionsfaktor des Analyten, der bei Verwendung des Lösungsmittels der Probe als mobile Phase erhalten wird.

$$L_I = t_I \cdot \mu_{eo} \cdot U_I \cdot L_G^{-1} (1+k_{LP})^{-1} \quad (14)$$

Zu einer erheblichen Retardierung des Analyten während der Probenaufgabe kommt es, wenn das zum Lösen der Probe verwendete Lösungsmittel eine geringere Elutionsstärke als die mobile Phase hat. Die Retardierung während der Probenaufgabe hat eine Anreicherung des Analyten in der stationären Phase und eine Fokussierung des Probenpfropfs zur Folge. Meist wird das Lösungsmittel so gewählt werden, daß sich die Probenbestandteile darin gut lösen. Ein solches Lösungsmittel besitzt dann auch eine hohe Elutionsstärke für die betrachteten Analyte, so daß die

Retardierung der Probenbestandteile während der Probenaufgabe meist vernachlässigt werden kann.

5.2 Berechnung der maximalen Probenpfropflänge

Um einen möglichen Beitrag der Probenaufgabe zur instrumentellen Bandenverbreiterung zu vermeiden, ist es notwendig die maximale Länge des Probenpfropfs $L_{I,max}$ zu kennen, die injiziert werden kann, ohne die Effizienz des Systems zu beeinträchtigen. Dies ist in der CEC besonders wichtig, weil die CEC eine hocheffiziente miniaturisierte Trennmethode ist, deren Leistungsfähigkeit nur bei geringfügiger instrumenteller Bandenverbreiterung genutzt werden kann [8].

Ein chromatographisches Signal wird durch verschiedene Prozesse innerhalb und außerhalb der Trennsäule verbreitert (siehe Abschnitt 2.1, S. 5). Im Idealfall wird ein GAUSS-förmiges Signal erhalten. Die Varianz der Gesamtverteilung der Analytmoleküle ist ein Maß für die Peakverbreiterung. STERNBERG [41] berechnete 1966 die Beiträge zur Bandenverbreiterung außerhalb der Trennsäule. Er zeigte, daß die Varianz der Gesamtverteilung gleich der Summe der Varianzen der Partialverteilungen ist. Die Partialverteilungen sind die Verteilungen aufgrund der einzelnen peakverbreiternden Prozesse. Diese sind der chromatographische Prozeß selbst, die Probenaufgabe und Beiträge der Detektion und der Datenaufzeichnung. Auch ein örtlicher radialer Temperaturgradient wirkt peakverbreiternd.

Überlegungen zum Beitrag der Probenaufgabe zur Bandenverbreiterung in der HPLC behandeln das maximale Injektionsvolumen in Abhängigkeit vom Peakvolumen. Diese Größen sind in der HPLC experimentell leicht zugänglich. Für die CEC sind sie allerdings wegen der dort auftretenden extrem kleinen Volumina sehr unhandlich. Ähnliches gilt für das in der HPLC übliche Maß für die Geschwindigkeit der mobilen Phase, die Flußrate (in mL/min). Daher ist es für die CEC sinnvoll, die in Bezug auf das

maximale Injektionsvolumen für die HPLC gemachten Überlegungen auf die Probenpfropflänge zu übertragen, da diese experimentell leicht zu ermitteln ist. Aus denselben Gründen wird in der CEC die Flußrate durch die lineare Fließgeschwindigkeit (in mm/s) der mobilen Phase ersetzt.

Der Beitrag der Probenaufgabe zur Bandenverbreiterung wird durch die Varianz der Eingabefunktion beschrieben. Die Eingabefunktion ist die Verteilung der Konzentration des Analyten als Funktion des Ortes in der Probenaufgabezone. Für die HPLC wird die Eingabefunktion als rechteckig angenommen, obwohl ein experimenteller Beweis fehlt [42]. Unter der Voraussetzung eines idealen Plug-flow sollte die Eingabefunktion in der CEC rechteckig sein. Für monolithische Kapillarsäulen ist ein idealer, kolbenförmiger Fluß der mobilen Phase experimentell nachgewiesen [32]. Im folgenden wird daher von einer rechteckigen Eingabefunktion ausgegangen.

Von den oben genannten peakverbreiternden Prozessen spielen in der CEC nur der eigentliche chromatographische Prozeß und die Probenaufgabe eine Rolle. Die Varianz σ_c^2 durch den chromatographischen Prozeß ist durch Gl. 14 gegeben. Gl. 14 leitet sich aus der Theorie der Böden ab [43]. Die Varianz σ_I^2 durch die Probenaufgabe ist durch Gl. 15 gegeben [41].

$$\sigma_c^2 = \frac{L_D^2}{N} \quad (14)$$

$$\sigma_I^2 = \frac{L_I^2}{12} \quad (15)$$

L_D = Länge der Kapillarsäule bis zum Detektor, N = Trennstufenzahl

Die Gesamtvarianz σ_G^2 des betrachteten Peaks ergibt sich aus der Summe der Teilvarianzen (Gl. 16).

$$\sigma_G^2 = \sigma_l^2 + \sigma_c^2 \quad (16)$$

In der Chromatographie wird eine Zunahme der Peakvarianz durch Bandenverbreiterung außerhalb der Trennstrecke um 10 % allgemein toleriert [42]. Aus diesem Entscheidungskriterium folgt Gl. 17.

$$\sigma_G^2 = 1,1 \cdot \sigma_c^2 \quad (17)$$

Die maximal zu injizierende Probenpfropflänge $L_{l,max}$ ist nach diesen Überlegungen durch Gl. 18 gegeben.

$$L_{l,max} = 1,1 \cdot \frac{L_D}{\sqrt{N}} \quad (18)$$

5.3 Experimentelle Überprüfung

Um die Gültigkeit von Gl. 18 experimentell zu überprüfen, wurden mehrere Benzoessäureester unter identischen Bedingungen getrennt. Lediglich die Probeaufgabeparameter U_l und t_l wurden variiert, so daß unterschiedlich lange Probenpfropfen injiziert wurden. Abb. 9 zeigt je ein Chromatogramm bei Injektion einer Probenzone mit $L_l = 0,07$ mm und $L_l = 5,3$ mm. Zum Lösen der Probe wurde AcCN verwendet. Dieses hat eine größere Elutionsstärke als die verwendete mobile Phase (AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v), so daß die Anreicherung der Analyte durch die stationäre Phase während der Probeaufgabe vernachlässigt werden kann. Die Längen der Probeaufgabebzonen wurden deshalb aus U_l und t_l nach Gl. 13 berechnet. μ_{eo} wurde aus t_0 nach den Gl. 24 und 25, S. 55, bestimmt.

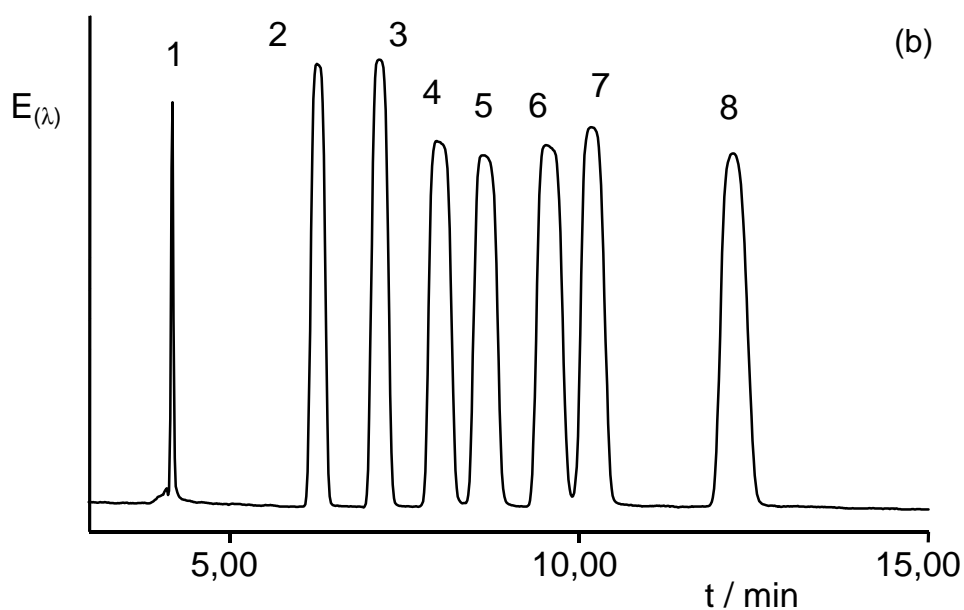
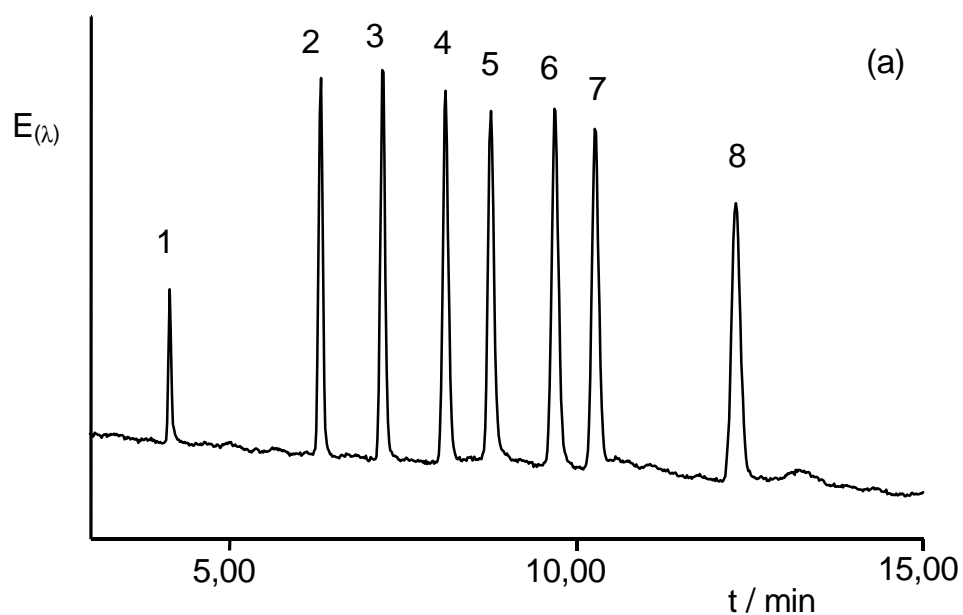


Abb. 9: Chromatogramme von Benzoessäureestern bei (a) $L_1 = 0,07$ mm und (b) $L_1 = 5,3$ mm. Kapillarsäule, $L = 310(258)$ mm \times 180 μ m I.D., stationäre Phase YMC ODS $d_p = 1,5$ μ m, mobile Phase AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v, Trennungsspannung 15 kV, elektrokin. Probenaufgabe, (a) 1 kV für 1 s, (b) 15 kV für 5 s, photometrische In-column-Detektion, $\lambda = 230$ nm, Analyte, 1 = Thioharnstoff, 2 = Benzoessäuremethylester, 3 = Benzoessäureethylester, 4 = Benzoessäurephenylester, 5 = Benzoessäurebenzylester, 6 = Benzoessäure-*p*-tolylester, 7 = Benzoessäurebutylester, 8 = Benzoessäure-*i*-pentylester

Für $L_i = 0,07$ mm wird für alle Signale eine gute Auflösung erhalten und die Peaks weichen kaum von der GAUSS-Form ab. Die Trennstufenzahlen betragen 40000 - 50000. Für $L_i = 5,3$ mm dagegen sind die Peaks stark verbreitert. Ihre Form weicht aufgrund extremer Volumenüberladung der Kapillarsäule stark von der GAUSS-Form ab. Die Auflösung wurde erheblich vermindert. Die Trennstufenzahlen sind um einen Faktor 8 - 16 gesunken.

Diese beiden Beispiele belegen den starken Einfluß der Probenaufgabe auf die Effizienz in der CEC. Interessanterweise wird der Peak des t_0 -Markers Thioharnstoff scheinbar nicht von der Länge der aufgegebenen Analytzone beeinflusst. Im Gegensatz zu den übrigen Analyten ist Thioharnstoff relativ polar. Die Endfritten der Kapillarsäule sind aus nativem Silikagel hergestellt. Das Lösungsmittel der Probe AcCN ist relativ unpolar. Daher wird Thioharnstoff an dem polaren Material der Fritte retardiert und sein Probenpfropf fokussiert (siehe Abschnitt 5.5, S. 50).

In Abb. 10 ist die Halbwertsbreite $w_{1/2}$ der Peaks der Benzoessäureester in mm gegen die Länge des aufgegebenen Probenpfropfs in mm aufgetragen. Für kleine L_i ist $w_{1/2}$ unabhängig von der Länge des injizierten Probenpfropfs. Die Varianz der Peaks wird durch den chromatographischen Prozeß bestimmt. Ab einem bestimmten Schwellenwert für L_i ist $w_{1/2}$ proportional zur Länge des Probenpfropfs. In diesem Bereich dominiert die Probenaufgabe die Varianz der Peaks. Zur Herleitung von Gl. 18 wurde eine Zunahme der Peakvarianz um 10 % als zulässig angenommen. Das entspricht einer Zunahme von $w_{1/2}$ um 5%. Für die in Abb. 10 dargestellten Meßwerte ist bei Zugrundelegung dieses Kriteriums $L_{i,max} = 0,9$ mm. Nach Gl. 18 ist $L_{i,max} = 1,4$ mm. Dabei wurde für N eine mittlere Trennstufenzahl von 45000 für die verwendeten Analyte eingesetzt. Dies entspricht der im Mittel mit der verwendeten Kapillarsäule maximal erreichbaren Trennstufenzahl. L_D ist gleich 258 mm. Die Abweichung des experimentell bestimmten Werts für $L_{i,max}$ vom berechneten kann auf Inhomogenitäten im Fluß der mobilen Phase im Bereich der aufgabeseitigen Ab-

schlußfritte der Kapillarsäule zurückzuführen sein, so daß die Eingabefunktion nicht ideal rechteckig ist. Dies führt zu einer fehlerhaften Bestimmung von σ_l^2 aus den Probeaufgabeparametern und t_0 . Es ist daher notwendig, in Gl. 18 einen Korrekturfaktor F_l einzuführen. Man erhält Gl. 19.

$$L_{l,max} = 1,1 \cdot \frac{L_D}{F_l \cdot \sqrt{N}} \quad (19)$$

Im vorliegenden Fall ist $F_l = 1,5$. Weil F_l von lokalen Inhomogenitäten in der Fritte abhängt, muß sein Wert für ein gegebenes System experimentell ermittelt werden.

TERABE et al. [44] berechneten für die MEKC unter Verwendung von Gl. 18 $L_{l,max}$ für eine Kapillare mit $L_D = 500$ mm und einer Bodenhöhe $H = 2$ μ m. Der erhaltene Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten. Dieses Beispiel zeigt, daß Gl. 18 bei Abwesenheit von Fritten in der Kapillarsäule, wie bei der MEKC, gültig ist. Bei Verwendung von monolithischen Trennsäulen sollte Gl. 18 auch in der CEC gültig sein.

Unter den gewählten Bedingungen darf der injizierte Probenpfropf maximal ca. 1 mm lang sein. Das entspricht einer Aufgabespannung von 1 kV für 5 s. In der CEC beträgt die Aufgabespannung oft 5 - 10 kV für eine Aufgabedauer von ca. 5 - 10 s [27, 26, 45, 46]. Nach den obigen Ausführungen ist unter diesen Bedingungen von einem signifikanten Beitrag der Probenaufgabe zur Bandenverbreiterung auszugehen, so daß in der CEC gegenwärtig meist nicht bei der maximal möglichen Effizienz der Methode gearbeitet wird.

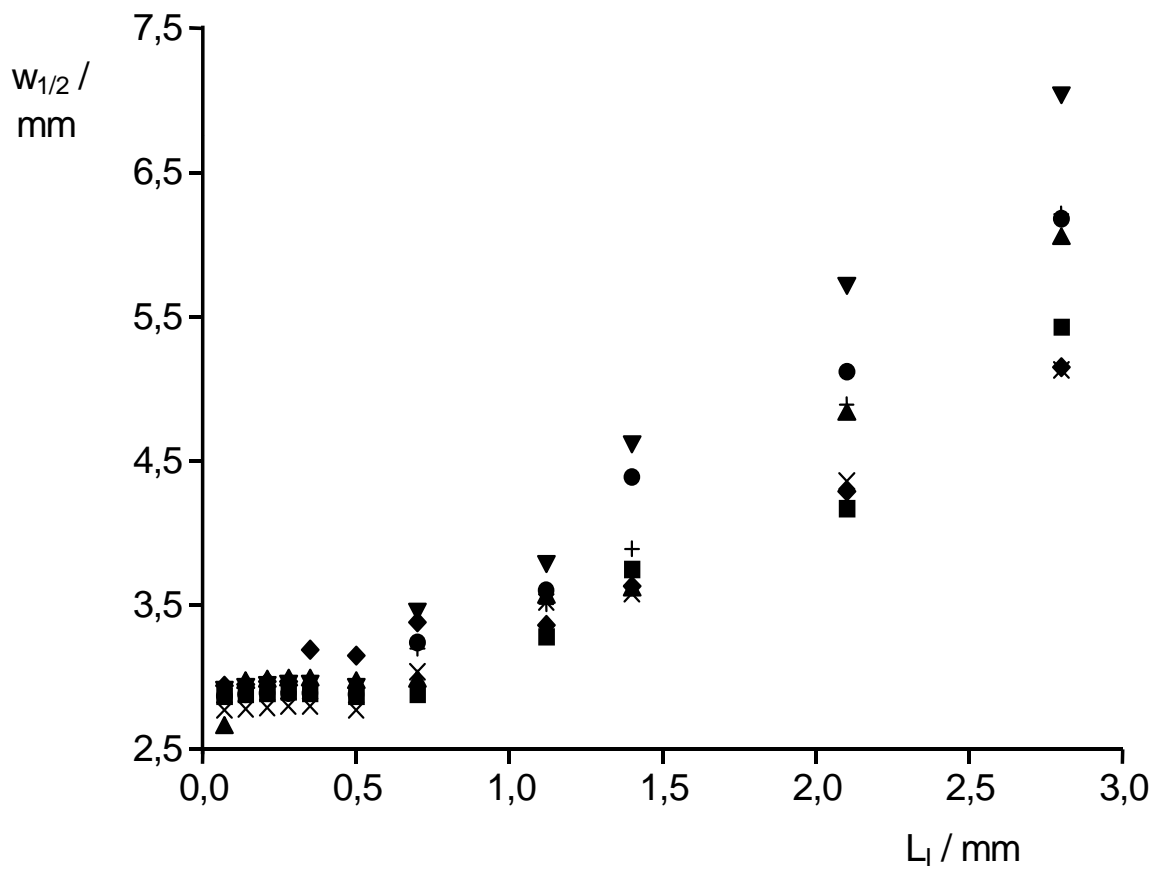


Abb. 10: Halbwertsbreite $w_{1/2}$ als Funktion der Probenpfropflänge L_l für verschiedene Benzoessäureester. ■ = Benzoessäuremethylester, ● = Benzoessäureethylester, ▲ = Benzoessäurebenzylester, ▼ = Benzoessäure-*p*-tolylester, ◆ = Benzoessäure-*i*-pentylester, + = Benzoessäurephenylester, X = Benzoessäurebutylester, Meßbedingungen siehe Abb. 9

5.4 Berechnung optimaler Probeaufgabeparameter

Unter Verwendung von Gl. 13 und Gl. 19 lassen sich die maximal zulässigen Probeaufgabeparameter bestimmen. Ist t_l vorgegeben, lässt sich nach Gl. 20 die maximal zulässige Aufgabespannung $U_{l,max}$ berechnen. Bei vorgegebenem Wert für U_l ist nach Gl. 21 die maximal zulässige Aufgabezeit $t_{l,max}$ zu bestimmen.

$$U_{l,max} = 1,1 \cdot \frac{L_D \cdot L_G}{F_l \cdot t_l \cdot \mu_{eo} \cdot \sqrt{N}} \quad (20)$$

$$t_{l,max} = 1,1 \cdot \frac{L_D \cdot L_G}{F_l \cdot U_l \cdot \mu_{eo} \cdot \sqrt{N}} \quad (21)$$

Die Gl. 20 und 21 sind nur dann gültig, wenn die Anreicherung der Analyten in der Probeaufgabebzone vernachlässigt werden kann. Ist die Elutionsstärke des zum Lösen der Probe verwendeten Lösungsmittels geringer als die der zur Trennung verwendeten mobilen Phase, ist die Anreicherung nicht mehr länger zu vernachlässigen. Aus Gl. 20 wird Gl. 22 und aus Gl. 21 wird Gl. 23.

$$U_{l,max} = 1,1 \cdot \frac{L_D \cdot L_G \cdot (k_{LP,1} + 1)}{F_l \cdot t_l \cdot \mu_{eo} \cdot \sqrt{N}} \quad (22)$$

$$t_{l,max} = 1,1 \cdot \frac{L_D \cdot L_G \cdot (k_{LP,1} + 1)}{F_l \cdot U_l \cdot \mu_{eo} \cdot \sqrt{N}} \quad (23)$$

$k_{LP,1}$ ist der Retentionsfaktor des zuerst eluierten Analyten bei Verwendung des Lösungsmittels der Probe als mobile Phase. Da der Probenpfropf dieses Analyten am wenigsten durch die Anreicherung in der stationären Phase fokussiert wird, ist die Beeinflussung von $L_{l,max}$ aufgrund

der Anreicherung der Analyten durch dessen k -Wert bestimmt. Für offene Filmkapillaren und monolithische Kapillarsäulen kann $F_1 = 1$ gesetzt werden. Bei Verwendung gepackter Kapillarsäulen mit Abschlußfritten ist F_1 experimentell zu bestimmen.

5.5 Anreicherung des Analyten bei der Probenaufgabe

Wie bereits mehrfach erwähnt, kommt es zur Anreicherung der Analyten in der stationären Phase, wenn diese bereits während der Probenaufgabe retardiert werden. Dadurch wird der Probenpfropf fokussiert. Dieser Effekt kann gezielt genutzt werden, um trotz der Aufgabe großer Probenmengen, d. h. eines langen Probenpfropfs, die Effizienz des chromatographischen Systems zu erhalten. Gleichzeitig läßt sich so die Empfindlichkeit eines Verfahrens steigern.

In einem Experiment wurden mehrere Benzoessäureester elektrochromatographisch getrennt. Bis auf die Zusammensetzung der Probenlösung wurden alle übrigen Parameter der Trennung konstant gehalten. Die Probenlösung bestand aus einer AcCN/Wasser-Mischung. Die Probenaufgabeparameter wurden so gewählt, daß ohne Fokussierung des Probenpfropfs von einem starken Beitrag der Probenaufgabe zur Bandenverbreiterung ausgegangen werden kann ($L_1 = 6,1$ mm). Der Volumenanteil ϕ des AcCN in der Probenlösung wurde variiert. Bei sinkendem Wert für $\phi(\text{AcCN})$ sollten die unpolaren Ester zunehmend an dem unpolaren Packungsmaterial retardiert und ihre Probenpfropfen fokussiert werden.

Abb. 11 zeigt je ein Chromatogramm für $\phi(\text{AcCN}) = 0,5$ und $\phi(\text{AcCN}) = 1$. Für $\phi(\text{AcCN}) = 1$ sind die Peaks infolge Volumenüberladung der Kapillarsäule stark verbreitert und weichen stark von der GAUSS-Form ab. Für $\phi(\text{AcCN}) = 0,5$ sind die Peaks GAUSS-förmig. Die Auflösung für die Signale hat sich sehr verbessert. So sind die Peaks von Benzoesäurepropylester und Benzoesäurebutylester bis zur Basislinie getrennt. Bei $\phi(\text{AcCN}) = 1$ überlappen ihre Peaks. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konzentration der Analyte in der Probenlösung ($c = 0,2 \text{ g/L}$ bei $\phi(\text{AcCN}) = 0,5$; $c = 0,25 \text{ g/L}$ bei $\phi(\text{AcCN}) = 1$) wurde bei $\phi(\text{AcCN}) = 0,5$ gegenüber $\phi(\text{AcCN}) = 1$ die Empfindlichkeit des Verfahrens um einen Faktor 6 verbessert. Zur Bestimmung dieses Faktors wurden die Peakhöhen verglichen.

Die Chromatogramme zeigen, daß der Einfluß des AcCN-Gehalts der Probenlösung auf die Verbreiterung des Peaks des polaren t_0 -Markers Thioharnstoff genau umgekehrt ist, wie auf die Verbreiterung der Peaks der unpolaren Ester. Bei $\phi(\text{AcCN}) = 0,5$ ist Thioharnstoff besser in der mobilen Phase löslich und wird daher weniger stark retardiert ($w_{1/2} = 11,6 \text{ mm}$). Bei $\phi(\text{AcCN}) = 1$ wird Thioharnstoff retardiert und sein Probenpfropf damit fokussiert ($w_{1/2} = 5,5 \text{ mm}$). Das Verhalten von Thioharnstoff zeigt, daß dieser Analyt an dem polaren Frittenmaterial retardiert wird und nicht an dem unpolaren Packungsmaterial.

In Abb. 12 ist $w_{1/2}$ der Benzoesäureester gegen den Volumenanteil ϕ von Acetonitril in der Probenlösung aufgetragen. Bis $\phi(\text{AcCN}) = 0,7$ ist $w_{1/2}$ unabhängig vom Volumenanteil AcCN in der Probenlösung. Für $\phi(\text{AcCN}) > 0,7$ ist $w_{1/2}$ proportional zum Volumenanteil AcCN. Dabei steigt bei $\phi(\text{AcCN}) = 1$ der Wert für $w_{1/2}$ gegenüber dem bei $\phi(\text{AcCN}) = 0,7$ auf das 2 bis 2,5-fache an.

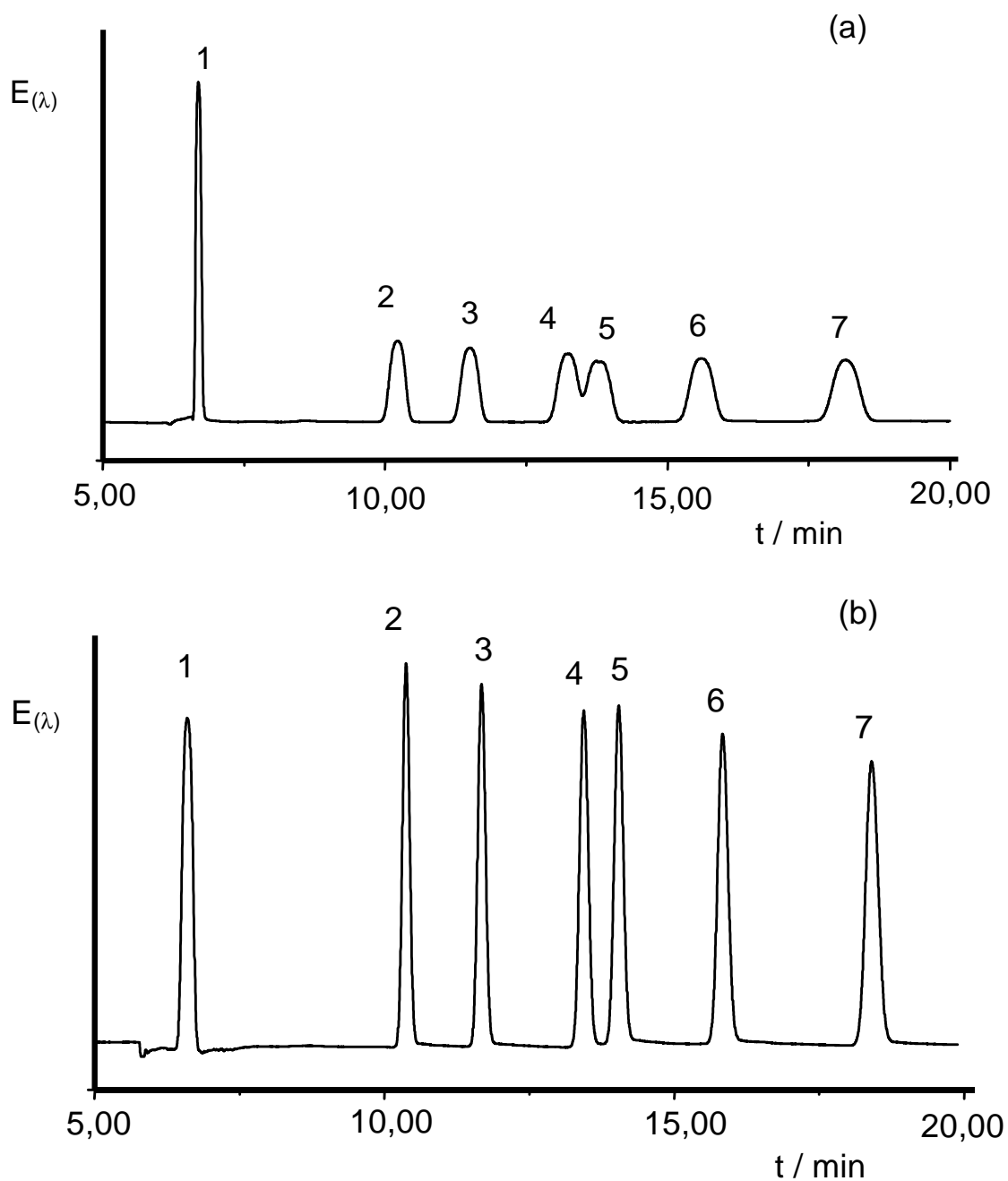


Abb. 11: Chromatogramme mehrerer Benzoesäureester bei (a) $\phi(\text{AcCN}) = 1$ und (b) $\phi(\text{AcCN}) = 0,5$. Kapillarsäule, $L = 395(345) \text{ mm} \times 180 \text{ }\mu\text{m}$ I.D., stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \text{ }\mu\text{m}$, mobile Phase AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v, Trennspannung 25 kV, elektrokin. Probenaufgabe, 23 kV für 7s, photometrische In-column Detektion, $\lambda = 230 \text{ nm}$, Analyte, 1 = Thioharnstoff, 2 = Benzoesäuremethylester, 3 = Benzoesäureethylester, 4 = Benzoesäurepropylester, 5 = Benzoesäurebenzylester, 6 = Benzoesäurebutylester, 7 = Benzoesäure-*i*-pentylester

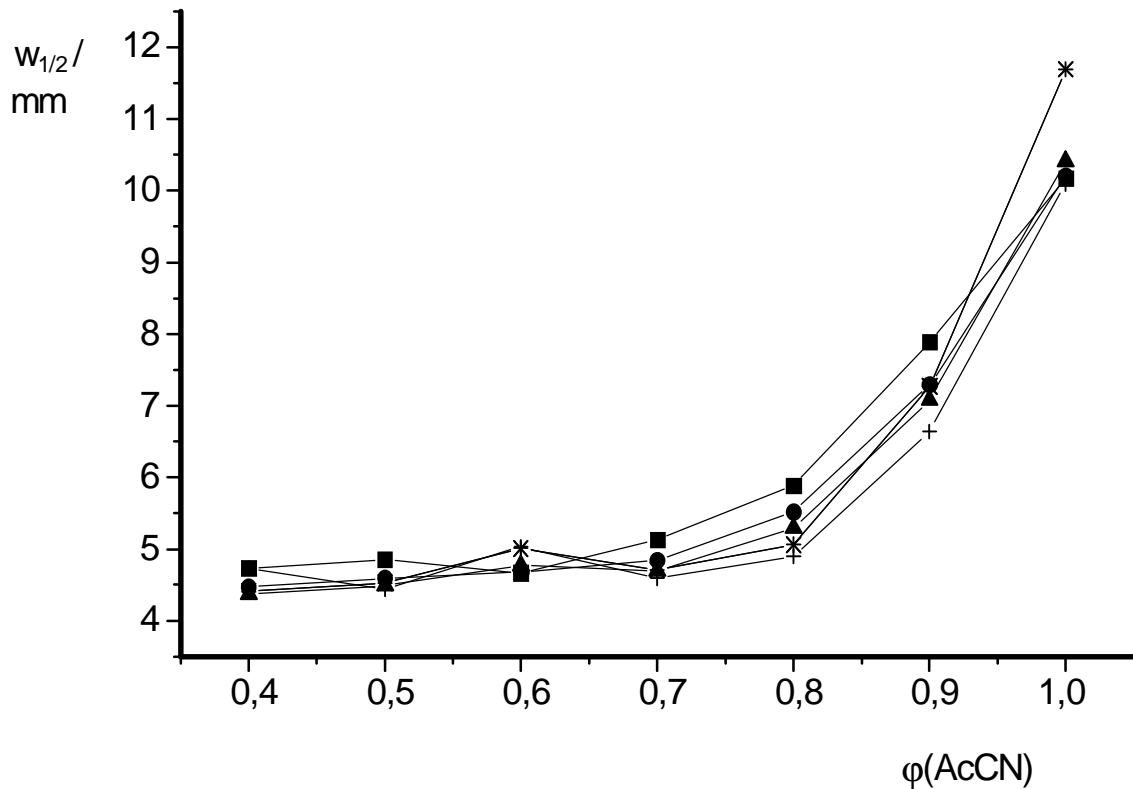


Abb. 12: Halbwertsbreite $w_{1/2}$ als Funktion von $\phi(\text{AcCN})$ in der Probenlösung. ■ = Benzoessäuremethylester, ● = Benzoessäureethylester, ▲ = Benzoessäurepropylester, * = Benzoessäurebenzylester, X = Benzoessäurebutylester, + = Benzoessäure-*i*-pentylester, Meßbedingungen siehe Abb. 11

Das Experiment zeigt, daß durch Verringerung des AcCN-Gehalts der Probenlösung sich ein Beitrag der Probenaufgabe zur Bandenverbreiterung trotz großer Probenpfropflänge vermeiden läßt. Mit $\phi(\text{AcCN}) < 0,7$ läßt sich $w_{1/2}$ nicht weiter reduzieren, da die Bandenverbreiterung nunmehr ausschließlich durch den chromatographischen Prozeß bestimmt wird. Die vorgestellte Technik ermöglicht es, die Empfindlichkeit eines Verfahrens durch die Aufgabe großer Probenvolumina zu steigern, ohne die Effizienz des chromatographischen Systems zu verringern.

6 Einfluß der Zusammensetzung der mobilen Phase auf elektrochromatographische Trennungen

6.1 Einführung

In der CEC wird die mobile Phase durch den EOF angetrieben. Da der EOF an der Grenzfläche zwischen der mobilen und der stationären Phase generiert wird, ist seine Stärke durch die Eigenschaften beider Phasen bestimmt. Bei der Optimierung der Zusammensetzung der mobilen Phase muß neben der gezielten Beeinflussung der Retention der Analyte und der Selektivität des Trennsystems auch die Erzielung eines hinreichend schnellen EOF berücksichtigt werden. Dies ist besonders wichtig, da die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase einen entscheidenden Einfluß auf die Effizienz des Systems hat. Da eine fundierte theoretische Basis für die Beschreibung des EOF in porösen Medien, wie sie die gepackten Kapillaren darstellen, noch aussteht [47], ist die Untersuchung des Einflusses der Beschaffenheit der mobilen und der stationären Phase auf den EOF für die Entwicklung der CEC von besonderer Wichtigkeit. Im folgenden wird der Einfluß der Zusammensetzung der mobilen Phase auf den EOF untersucht. Auch der Einfluß auf die Retention der Analyte, die Selektivität des Trennsystems und seine Effizienz wird untersucht.

6.2 Variation der Ionenstärke der mobilen Phase

6.2.1 Einfluß der Ionenstärke auf den elektroosmotischen Fluß

In der CEC werden meist RP-Materialien als stationäre Phase und Gemische aus AcCN und einer wäßrigen Pufferlösung als mobile Phase verwendet. Als Puffer werden z.B. Dihydrogenphosphat/Hydrogenphosphat-Puffer [48], Boratpuffer [36] oder Tris-HCl-Puffer [12] verwendet (Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan). Neben dem Wassergehalt der mobilen Phase und dem verwendeten organischen Modifier bestimmen die Konzentrationen der Puffersalze die Geschwindigkeit des EOF.

Als Maß für die Geschwindigkeit des EOF wird in der CEC die lineare elektroosmotische Fließgeschwindigkeit v_{eo} angegeben. v_{eo} berechnet sich nach Gl. 24.

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E \quad (24)$$

μ_{eo} = elektroosmotische Beweglichkeit E = elektrische Feldstärke

v_{eo} läßt sich nach Gl. 25 aus der Totzeit t_0 des Systems und der Länge der Kapillare bis zum Detektor L_D bestimmen.

$$v_{eo} = L_D / t_0 \quad (25)$$

μ_{eo} berechnet sich für offene Kapillaren nach Gl. 26 [49].

$$\mu_{eo} = \frac{\sigma \cdot \delta}{\eta} \quad (26)$$

σ = Oberflächenladungsdichte δ = Dicke der elektr. Doppelschicht

η = Viskosität der mobilen Phase

δ ist nach Gl. 27 umgekehrt proportional zur Ionenstärke I [50].

$$\delta = \sqrt{\frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot k \cdot T}{2 \cdot N_A \cdot e^2 \cdot I}} \quad (27)$$

$$\text{mit } I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 \cdot c_i$$

ϵ_r = relative Dielektrizitätskonstante der mobilen Phase

ϵ_0 = elektrische Feldkonstante z = Ladungszahl des Ions

k = Boltzmannkonstante c = Konzentration

T = Temperatur N_A = Avogadrokonstante

e = Elementarladung

Die Kanäle zwischen den Packungsteilchen einer gepackten Kapillarsäule können als Kapillaren beschrieben werden. Folglich läßt sich die gepackte Kapillarsäule als Bündel von Kapillaren approximieren. Unter dieser Annahme sollten die Gl. 26 und 27 auch für gepackte Kapillarsäulen gelten. WAN [51] untersuchte μ_{eo} in Abhängigkeit von der Konzentration von Natriumphosphat ($c = 10^{-3} - 10^{-5}$ mmol/L) im Falle ungepackter und teilgepackter Kapillarsäulen. Als Packungsmaterial wurde ODS-Silikagel verwendet. Für offene Kapillarsäulen nahm μ_{eo} mit steigender Ionenstärke wie erwartet ab. Für teilgepackte Kapillarsäulen wurde für μ_{eo} ein Maximum im mittleren Bereich der gewählten Konzentrationsspanne ermittelt. KNOX und GRANT [9] bestimmten μ_{eo} in teilgepackten Kapillarsäulen in Abhängigkeit der Konzentration von NaH_2PO_4 in der mobilen Phase. Als mobile Phase verwendeten sie AcCN/Wasser 7:3, v/v. Sie ermittelten ein Maximum für μ_{eo} in einem Konzentrationsbereich des Puffersalzes von 0,3 bis 3 mmol/L. Auch DITTMANN und ROZING [10] untersuchten μ_{eo} in teilgepackten Kapillarsäulen. Sie fanden für $c = 2 - 20$ mmol/L des Puffers eine Abnahme von μ_{eo} mit steigender Pufferkonzentration. Sie verwendeten einen Tris-HCl Puffer.

Die Abhängigkeit von μ_{eo} von I kann wie folgt erklärt werden: Bei niedrigen Ionenstärken tritt eine Überlappung der elektrischen Doppelschichten in den Kanälen der Packung auf. Die Überlappung der Doppelschichten nimmt mit steigenden Wert für I ab, wodurch μ_{eo} bis zu dem beobachteten Maximum steigt. Wird I weiter erhöht, macht sich die Abnahme des elektrokinetischen Potentials mit zunehmender Ionenstärke bemerkbar. Man beobachtet dann bei gepackten Kapillarsäulen eine Abnahme von μ_{eo} mit zunehmender Ionenstärke wie im Falle offener Kapillarsäulen.

Bei Verwendung teilgepackter Kapillarsäulen ist der gemessene Wert von μ_{eo} bei gegebener mobiler Phase nicht allein durch die Eigenschaften der Packung bestimmt. Vielmehr setzt sich der gemessene Wert aus Anteilen von μ_{eo} im gepackten und μ_{eo} im ungepackten Teil der Kapillarsäule zusammen [52]. Um diese Störung zu umgehen, wurden in der vorliegenden

Arbeit zur Bestimmung von μ_{eo} nur vollständig gepackte Kapillarsäulen verwendet. Dazu wurde mit Thioharnstoff als inertem Tracer die Totzeit des Systems bestimmt und nach den Gl. 24 und 25, S. 55, μ_{eo} berechnet. Als mobile Phase wurde AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v verwendet. Die Phosphatkonzentration betrug 0,01 bis 7 mmol/L. Als stationäre Phase diente Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \mu\text{m}$. Das Experiment wurde mit zwei verschiedenen Kapillarsäulen wiederholt. Es wurden für jede Phosphatkonzentration mehrere Messungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Abb. 13 zeigt das Ergebnis für beide Kapillarsäulen.

Für beide Kapillarsäulen durchläuft μ_{eo} ein Maximum im Bereich von 0,4 bis 4 mmol/L. Dieses Ergebnis legt den Schluß nahe, daß unter den gewählten Bedingungen für $c < 0,4 \text{ mmol/L}$ eine Überlappung der elektrischen Doppelschichten auftritt. Ferner beobachtet man bei beiden Kapillarsäulen in diesem Konzentrationsbereich eine Abnahme der Reproduzierbarkeit von μ_{eo} . Für $c > 4 \text{ mmol/L}$ nimmt μ_{eo} mit steigender Phosphatkonzentration ab. In diesem Konzentrationsbereich verringert die Abnahme des elektrokinetischen Potentials μ_{eo} . Auffällig ist, daß die Werte für μ_{eo} im Falle von Kapillare 2 gegenüber denen für Kapillare 1 alle zu höheren Werten verschoben sind. Dies kann auf eine unterschiedliche Permeabilität der Abschlußfritten und eine unterschiedliche Packungsdichte zurückzuführen sein [52].

Das vorgestellte Ergebnis läßt den Schluß zu, daß in der CEC die Konzentration des Puffersalzes optimiert werden muß. Im Bereich zu hoher und zu niedriger Pufferkonzentrationen steigt infolge des kleinen Werts für μ_{eo} und des daraus resultierenden kleinen Werts für v_{eo} die Analysendauer. Ferner ist im Bereich kleiner Pufferkonzentrationen infolge der Abnahme der Reproduzierbarkeiten von μ_{eo} und v_{eo} auch mit einer Abnahme der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten der Analyte zu rechnen. Dies senkt die Genauigkeit quantitativer Bestimmungen. In der CEC sollte daher bei einer Puffersalzkonzentration von 0,4 bis 4 mmol/L gearbeitet werden, bei der μ_{eo} maximal ist.

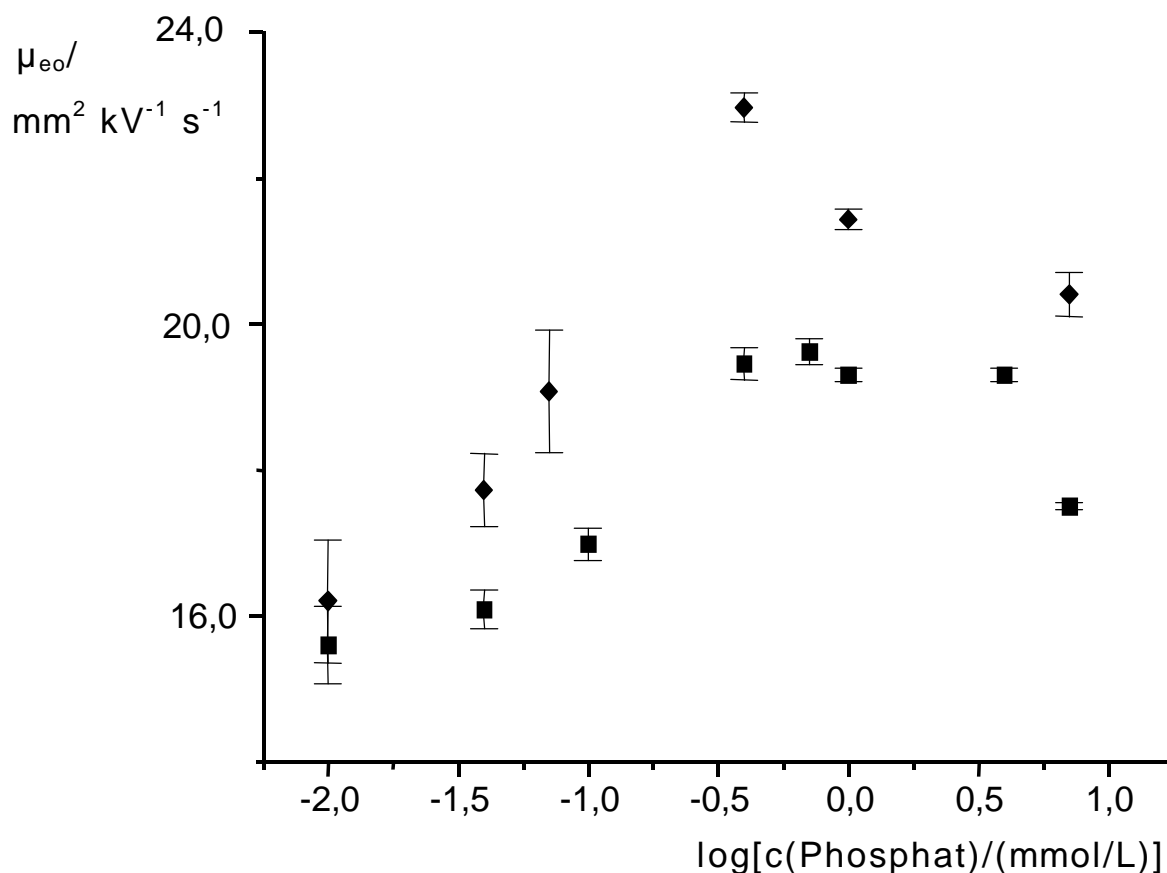


Abb. 13: Elektroosmotische Beweglichkeit μ_{eo} in Abhängigkeit des Logarithmus der Phosphatkonzentration der mobilen Phase. ■ = Kapillarsäule 1, $L = 442(390) \text{ mm} \times 100 \text{ } \mu\text{m}$ I.D., Mittelwerte aus 3 Messungen, ◆ = Kapillarsäule 2, $L = 422(376) \text{ mm} \times 100 \text{ } \mu\text{m}$ I.D., Mittelwerte aus 5 Messungen, Fehlerbalken = Standardabweichung, mobile Phase AcCN/Phosphatpuffer ($c = 0,01 - 7 \text{ mmol/L}$) 8:2 v/v, stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \text{ } \mu\text{m}$, Trennungsspannung = 25 kV, elektrokinetische Probenaufgabe, 5 s bei 5 kV, photometrische In-column-Detektion, $\lambda = 230 \text{ nm}$, Totzeitmarker Thioharnstoff

6.2.2 Einfluß der Ionenstärke auf die Retention der Analyte und die Trennstufenhöhe

Neben dem Einfluß der Ionenstärke auf μ_{eo} wurde auch deren Einfluß auf die Retentionsfaktoren k und die Trennstufenhöhe N verschiedener Analyte untersucht. Die Versuche wurden ebenfalls mit einer vollständig gepackten Kapillarsäule durchgeführt. Als mobile Phase wurde AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v verwendet. Der Konzentrationsbereich des Phosphatpuffers betrug 0,01 - 7 mmol/L. Die Probenaufgabespannung betrug bei jeder Messung 5 kV für eine Aufgabezeit von 5 s, so daß in Abhängigkeit von μ_{eo} und damit der Phosphatkonzentration Probenpfropfen von 1,1 - 1,4 mm Länge injiziert wurden. Unter diesen Bedingungen leistet die Probenaufgabe noch keinen signifikanten Beitrag zur Bandenverbreiterung. Abb. 14 zeigt ein Chromatogramm der verwendeten Testmischung aus verschiedenen Benzoessäureestern und PAH.

In Abb. 15 sind die Retentionsfaktoren k der Substanzen der Testmischung gegen den Logarithmus der Phosphatkonzentration aufgetragen. Für die aufgeführten Substanzen ist k unter den gewählten Bedingungen unabhängig von der Phosphatkonzentration. Die Puffersalzkonzentration hat keinen Einfluß auf die Verteilungskoeffizienten der Analyte zwischen der mobilen und der stationären Phase.

Abb. 16 zeigt exemplarisch die Abhängigkeit der Trennstufenzahl N für Benzoessäureethylester und Acenaphthen vom Logarithmus der Phosphatkonzentration. N wurde nach Gl. 1, S. 3, aus t_r und $w_{1/2}$ der Peaks berechnet. Unter den gewählten Bedingungen zeigt N keine signifikante Abhängigkeit von der Ionenstärke. Auffällig sind die großen Werte der Standardabweichung von N . Diese Werte belegen die systembedingte Ungenauigkeit bei der Bestimmung von N . Die Ursache für die hohe Ungenauigkeit bei der Bestimmung von N ist unklar. Die Halbwertsbreiten der Peaks in dem in Abb. 14 dargestellten Chromatogramm betragen 3 s (Thioharnstoff) bis 14 s (Pyren). In Bezug auf die Größe der Halbwertsbreiten sollte die gewählte Aufnahmefrequenz für die Datenpunkte durch

die Software (10 Hz) für eine genaue Wiedergabe der Halbwertsbreiten ausreichend sein. Für die übrigen Analyte wurde ein vergleichbares Ergebnis erhalten. Die Daten werden hier nicht gezeigt.

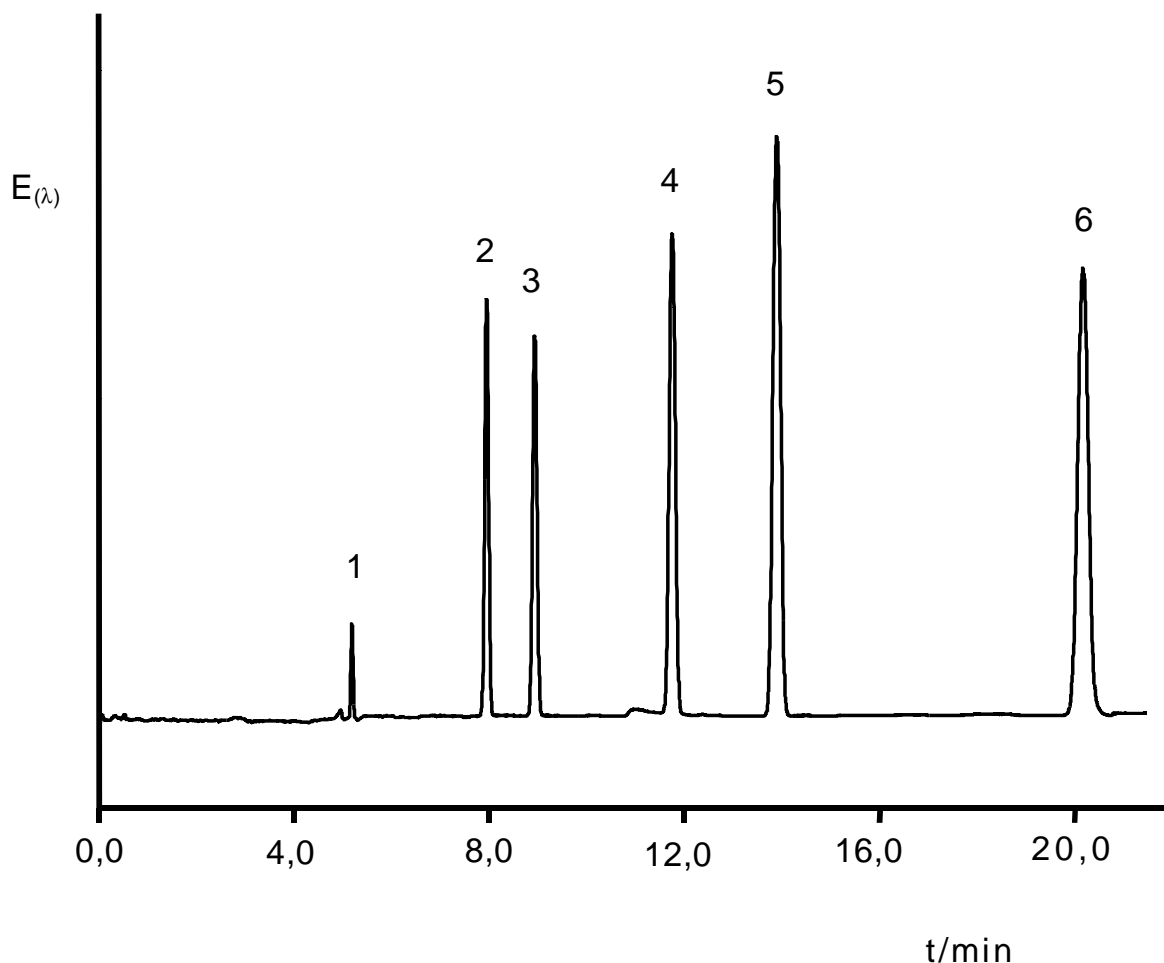


Abb. 14: Chromatogramm eines Gemisches aus Benzoessäureestern und PAH. Kapillarsäule, $L = 422(376) \text{ mm} \times 100 \text{ }\mu\text{m I.D.}$, stationäre Phase Nucleosil 100-3, $d_p = 3 \text{ }\mu\text{m}$, mobile Phase AcCN/Phosphatpuffer ($c = 0,4 \text{ mmol/L}$) 8:2, v/v, elektrokinetische Probenaufgabe, 5 s bei 5 kV, Trennungsspannung 25 kV, photometrische In-column-Detektion, $\lambda = 230 \text{ nm}$, Analyte: 1 = Thioharnstoff, 2 = Benzoessäuremethylester, 3 = Benzoessäureethylester, 4 = Acenaphthylen, 5 = Acenaphthen, 6 = Pyren

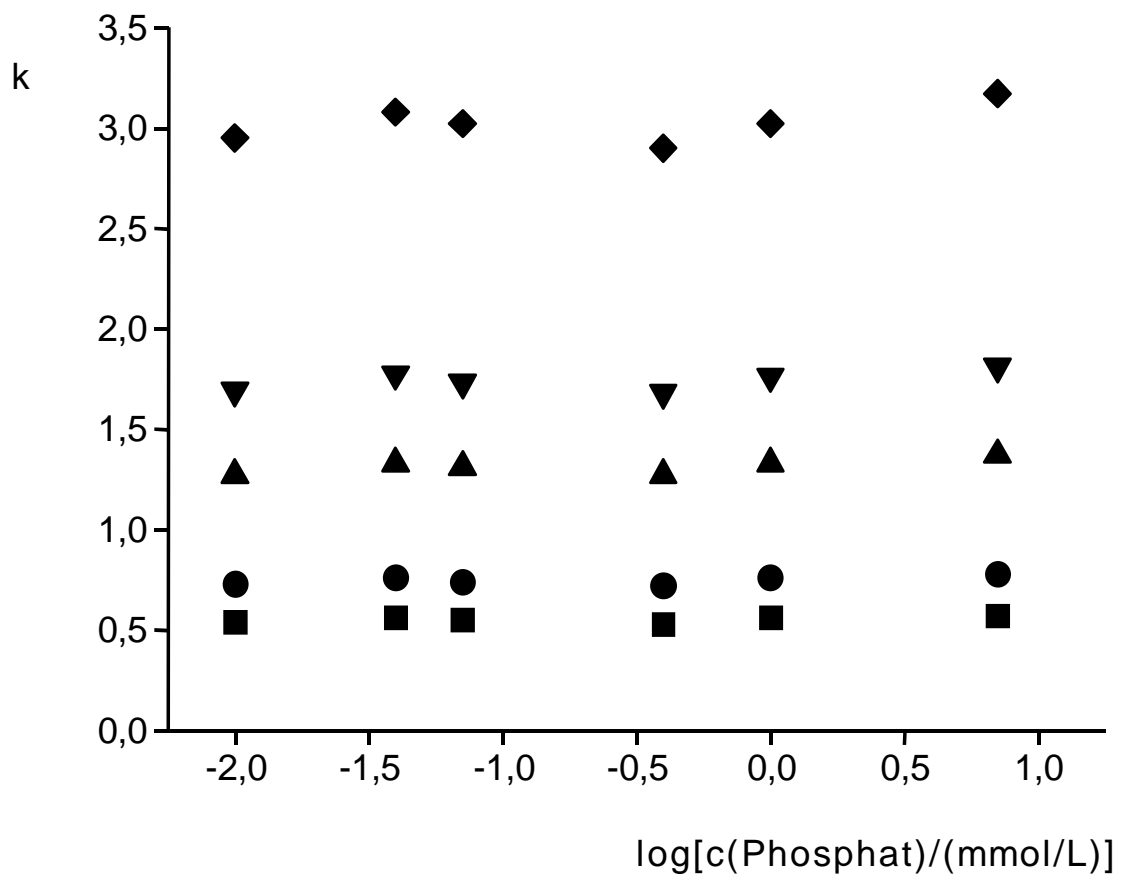


Abb. 15: Auftragung der Retentionsfaktoren k verschiedener Analyte gegen den Logarithmus der Phosphatkonzentration. Analyte: ■ = Benzoessäuremethylester, ● = Benzoessäureethylester, ▲ = Acenaphthylen, ▼ = Acenaphthen, ◆ = Pyren, Meßbedingungen siehe Abb. 14

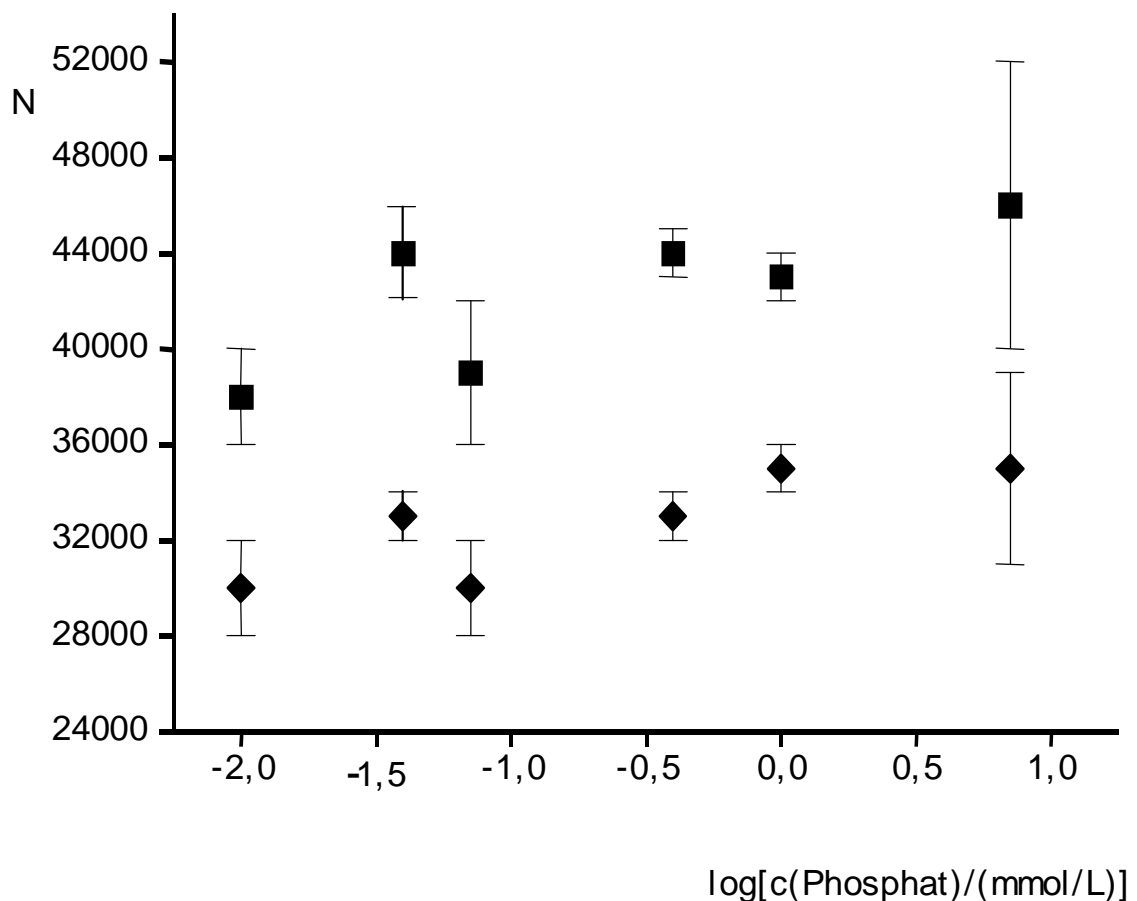


Abb. 16: Trennstufenzahl N als Funktion des Logarithmus der Phosphatkonzentration. ♦ = Acenaphthen, ■ = Benzoessäureethylester, Mittelwert aus 5 Messungen, Fehlerbalken = Standardabweichung, Meßbedingungen siehe Abb. 14

Die vorgestellten Untersuchungen zur Variation der Ionenstärke können wie folgt zusammengefaßt werden: Zur Erzielung eines hinreichend schnellen und stabilen EOF muß die Ionenstärke auf einen optimalen, experimentell zu ermittelnden Wert eingestellt werden. Unter den vorgestellten experimentellen Bedingungen hat I keinen Einfluß auf die Retention der Analyte und die Effizienz des chromatographischen Systems.

6.3 Variation des Modifiziergehalts der mobilen Phase

6.3.1 Einfluß des Modifiziergehalts auf den elektroosmotischen Fluß

Zur gezielten Variation der Retention der Analyte und der Selektivität des chromatographischen Systems wird in der RP-Chromatographie der Modifiziergehalt der mobilen Phase dem Trennproblem angepaßt. Eine Variation des Modifiziergehalts bewirkt eine Veränderung der Viskosität und der Dielektrizitätskonstanten der mobilen Phase. Dadurch bewirkt in der CEC die Variation des Modifiziergehalts eine Veränderung der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase. μ_{eo} läßt sich für offene und gepackte Kapillaren mit der HELMHOLTZ-SMOLUCHOWSKI-Gleichung (Gl. 28) beschreiben.

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot \zeta}{\eta} \quad (28)$$

ϵ_r = relative Dielektrizitätskonstante der mobilen Phase

ϵ_0 = elektrische Feldkonstante ζ = elektrokinetisches Potential

η = Viskosität der mobilen Phase

Nach Gl. 28 bestimmen der Koeffizient ϵ_r/η und ζ den Wert von μ_{eo} . SCHWER und KENNDLER [53] bestimmten μ_{eo} in offenen Quarzglaskapillaren in Abhängigkeit vom Volumenanteil verschiedener organischer Modifizier in wäßrigen mobilen Phasen bei konstanter Ionenstärke. Sie ermittelten eine kontinuierliche Abnahme von μ_{eo} mit steigendem Modifiziergehalt. Ihre Beobachtung erklärten sie mit einer Veränderung des Koeffizienten ϵ_r/η und einer Abnahme von ζ bei steigendem Modifiziergehalt.

Vergleichbare Untersuchungen unter Verwendung von mit ODS-Silikagel gepackten Kapillarsäulen führten zu anderen Ergebnissen. So ermittelten CHOUDHARY und HORVÁTH [52] ein Ansteigen von v_{eo} mit steigendem AcCN-Gehalt in wäßrigen mobilen Phasen. Dieses Ergebnis wird durch Messungen anderer Arbeitsgruppen bei Verwendung von AcCN als Modi-

fier bestätigt [10, 24]. Für Methanol (MeOH) als Modifier erhielten DITTMANN und ROZING [10] ein abweichendes Resultat. Sie beobachteten in diesem Fall ein Minimum für μ_{eo} bei einem Modifiiergehalt von 60%. Alle vorgestellten Untersuchungen wurden bei konstanter Ionenstärke durchgeführt.

Für die Variation von μ_{eo} mit der Veränderung des Modifiiergehalts wird im Falle gepackter Kapillarsäulen oft nur die Veränderung des Koeffizienten ε_r/η in Gl. 28 genannt [19]. Die vorgestellten Ergebnisse lassen allerdings den Schluß zu, daß bei Verwendung bestimmter Modifier auch die Veränderung von ζ eine Rolle spielt. So konnten DITTMANN und ROZING [10] ihre Ergebnisse für MeOH als Modifier mit der Veränderung von ε_r/η korrelieren, während sich das Ergebnis für AcCN nur mit einer zusätzlichen Veränderung von ζ und damit der Oberflächenladungsdichte σ der stationären Phase erklären ließ. Die Autoren berechneten für AcCN und MeOH den Verlauf von σ bei Variation des Modifiiergehalts. Für AcCN ermittelten sie im Gegensatz zu MeOH ein Maximum für σ bei einem Modifiiergehalt von 40 - 60 %. Der beschriebene Verlauf von σ bei Erhöhung des AcCN-Gehalts der mobilen Phase bewirkt ein Ansteigen von μ_{eo} .

In den oben genannten Arbeiten wurden teilgepackte Kapillarsäulen verwendet. Der gemessene Wert von μ_{eo} setzt sich damit aus den Anteilen von μ_{eo} im gepackten Teil und μ_{eo} im ungepackten Teil der Kapillarsäule zusammen. Um diese Störung zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit μ_{eo} in vollständig gepackten Kapillarsäulen bestimmt. Als Packungsmaterial diente Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \mu\text{m}$. Als Modifier wurden Aceton und AcCN verwendet. Dabei wurde für Aceton eine Kapillarsäule anderer Dimensionen als für AcCN benutzt. Der Volumenanteil des Modifiers in der mobilen Phase $\varphi(\text{Mod})$ betrug 50 - 80 %, v/v. Als wäßrige Pufferlösung fand Phosphatpuffer Verwendung. Die Phosphatkonzentration in der Mischphase wurde konstant gehalten und betrug im Falle des AcCN 0,8 mmol/L und im Falle des Acetons 0,4 mmol/L. Als Totzeitmarker wurde Thioharnstoff verwendet. Für jeden Modifiiergehalt wurde t_0

dreimal bestimmt und der Mittelwert berechnet. Daraus wurde nach den Gl. 24 und 25, S. 55, μ_{eo} bestimmt.

In Abb. 17 sind die Werte für μ_{eo} in Abhängigkeit von $\varphi(\text{Mod})$ für AcCN und Aceton aufgetragen. Für AcCN steigt μ_{eo} kontinuierlich mit steigendem Modifiziergehalt an. Diese Beobachtung stimmt mit der anderer Arbeitsgruppen [10, 24, 52] überein. Für Aceton als Modifier steigt μ_{eo} ebenfalls kontinuierlich mit steigendem Modifiziergehalt der mobilen Phase.

Das vorgestellte Ergebnis lässt sich nicht ausschließlich durch eine Veränderung des Koeffizienten ε_r/η erklären. ε_r/η durchläuft für beide Lösungsmittel ein Minimum bei steigendem Modifiziergehalt [53]. Der Verlauf von μ_{eo} als Funktion des Modifiziergehalts sollte diesen Zusammenhang qualitativ wiedergeben. Die beobachtete Abweichung davon legt eine Veränderung von ζ und damit der Oberflächenladungsdichte σ des Packungsmaterials nahe.

Um die Veränderung von ζ zu untersuchen, wurde σ in Abhängigkeit des Modifiziergehalts bestimmt. σ lässt sich nach Gl. 29 berechnen.

$$\sigma = \varepsilon_0 \varepsilon_r \kappa \zeta \quad (29)$$

Darin ist κ der DEBYE-HÜCKEL-Parameter (Gl. 30).

$$\kappa = \sqrt{\frac{2 \cdot I \cdot F^2}{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot R \cdot T}} \quad (30)$$

F = Faraday-Konstante

T = Temperatur

R = Gaskonstante

I = Ionenstärke

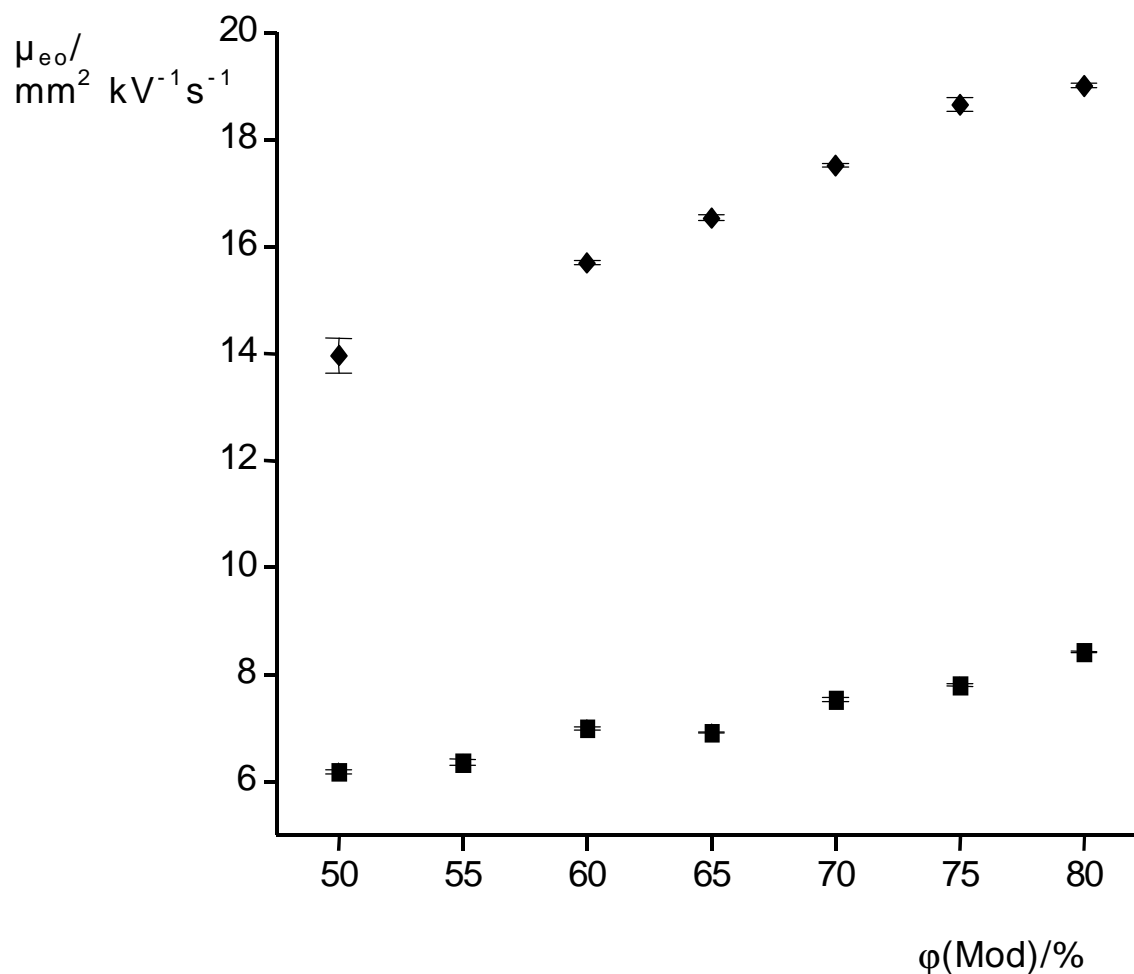


Abb. 17: μ_{eo} als Funktion des Modifiziergehalts $\phi(\text{Mod})$ in der mobilen Phase. ■ = Aceton/Phosphatpuffer ($c = 0,4 \text{ mmol/L}$), Kapillarsäule, $L = 382(327) \text{ mm} \times 150 \text{ } \mu\text{m I.D.}$, Trennungsspannung 24 kV , elektrokinetische Probenaufgabe, 3 s bei 2 kV , ♦ = AcCN/Phosphatpuffer ($c = 0,8 \text{ mmol/L}$), Kapillarsäule, $L = 442(390) \text{ mm} \times 100 \text{ } \mu\text{m I.D.}$, Trennungsspannung 25 kV , elektrokinetische Probenaufgabe, 8 s bei 2 kV , jeweils Mittelwert aus 3 Messungen, Fehlerbalken = Standardabweichung Totzeitmarker Thioharnstoff, photometrische In-column-Detektion, $\lambda = 230 \text{ nm}$

ζ wurde aus μ_{eo} nach Gl. 28, S. 63, berechnet. Die Werte für ε_r und η wurden [53] entnommen. Die Ionenstärke I betrug bei Verwendung von AcCN als Modifier 4,2 mmol/L und bei Verwendung von Aceton 2,1 mmol/L. I wurde aus der Konzentration des Phosphatpuffers in der Mischphase nach Gl. 27, S. 55, berechnet. Diese betrug bei Verwendung von AcCN als Modifier 0,8 mmol/L und bei Verwendung von Aceton 0,4 mmol/L. σ wurde für $T = 293$ K bestimmt. Abb. 18 gibt die berechneten Werte für σ für Aceton und AcCN wieder.

Für beide Lösungsmittel durchläuft σ ein Maximum bei steigendem Modifiziergehalt. Dabei erreicht σ das Maximum bei Verwendung von Aceton bei $\phi(\text{Mod}) = 55\text{-}65\%$, bei Verwendung von AcCN bei $\phi(\text{Mod}) = 60\text{-}70\%$. Der gefundene Zusammenhang zwischen σ und dem Modifiziergehalt entspricht im Falle des AcCN den Ergebnissen anderer Autoren bei Verwendung teilgepackter Kapillarsäulen [10]. Der Einfluß des ungepackten Teils der Kapillarsäule ist für die vorliegenden Untersuchungen also vernachlässigbar klein. Unter den gewählten Bedingungen bewirkt die Erhöhung des Modifiziergehalts nicht nur eine Veränderung des Koeffizienten ε_r/η . Auch die Oberflächenladungsdichte σ der stationären Phase wird für AcCN und Aceton in vergleichbarer Weise bei Erhöhung des Modifiziergehalts verändert. Beide Faktoren zusammen sind für das beobachtete Ansteigen von μ_{eo} mit steigendem Modifiziergehalt verantwortlich. Die Gründe für die beobachtete Veränderung von σ sind noch weitgehend unbekannt. Als mögliche Ursachen kommen unterschiedliche Sorption des Modifiers an der stationären Phase oder Konformationsänderungen der ODS-Ketten des Packungsmaterials bei wechselndem Modifiziergehalt in Betracht [54].

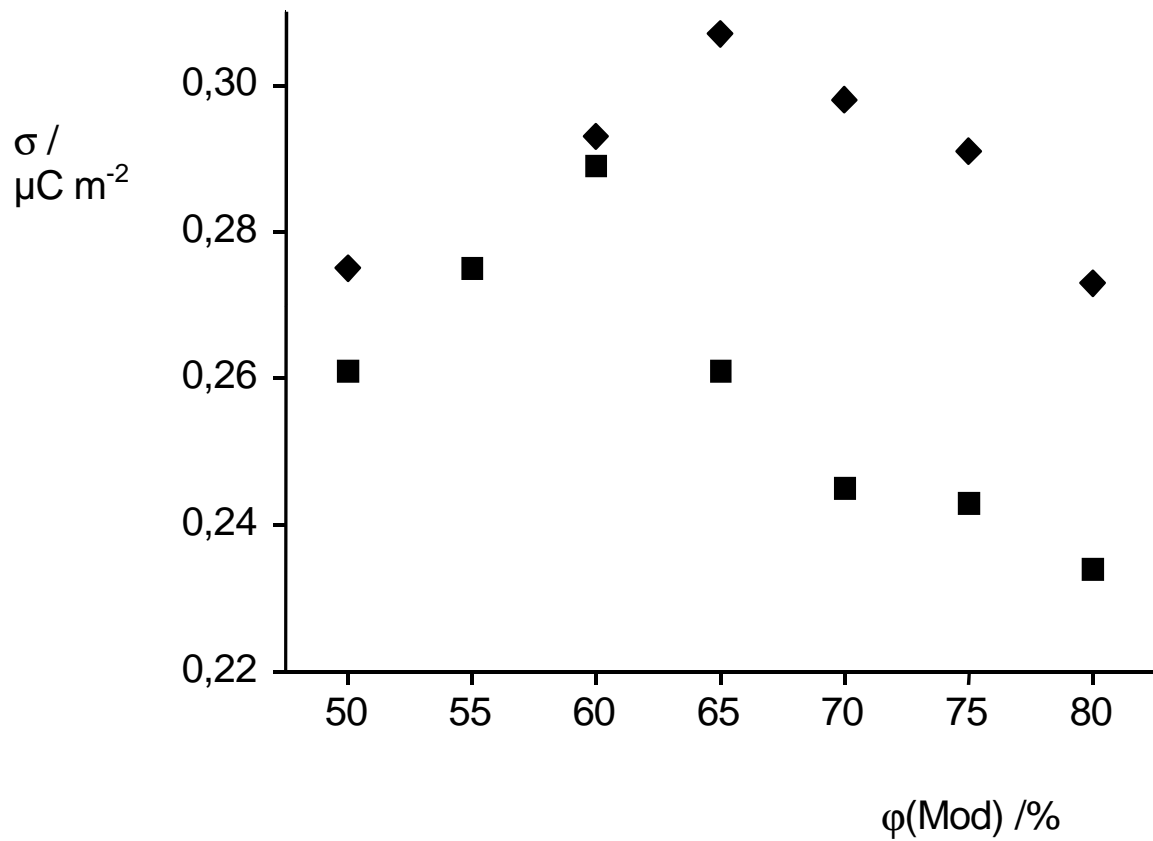


Abb. 18: Oberflächenladungsdichte σ in Abhängigkeit des Modifiziergehalts $\phi(\text{Mod})$ der mobilen Phase. ■ = Aceton/Phosphatpuffer ($c = 0,4 \text{ mmol/L}$), ◆ = AcCN/Phosphatpuffer ($c = 0,8 \text{ mmol/L}$), experimentelle Bedingungen siehe Abb. 17

6.3.2 Einfluß des Modifiziergehalts auf die Retention der Analyte und die Trennstufenhöhe

In der RP-HPLC führt die Erhöhung des Anteils des organischen Modifiers in der wäßrigen mobilen Phase im allgemeinen zu einer Verringerung der Retention der Analyte [55]. Dabei sinkt $\ln(k)$ meist linear mit Erhöhung des Modifiziergehalts. Da der RP-CEC grundsätzlich derselbe Trennmechanismus zugrunde liegt, wie der RP-HPLC [56], sollte dieser Zusammenhang auch für diese Methode gelten. Um dies zu überprüfen, wurde ein Gemisch aus Benzoessäureestern bei verschiedenem Modifiziergehalt getrennt und $\ln(k)$ bestimmt. Auch der Einfluß des Modifiziergehalts auf die Trennstufenhöhe N wurde untersucht. Es wurde eine vollständig gepackte Kapillarsäule verwendet. Als mobile Phase wurde AcCN/Phosphatpuffer verwendet. Der Anteil $\phi(\text{Mod})$ des Modifiers AcCN betrug 50-80% v/v. Abb. 19 zeigt je ein Chromatogramm der verwendeten Testmischung für $\phi(\text{Mod}) = 80\%$ und $\phi(\text{Mod}) = 60\%$. Mit sinkendem Wert für $\phi(\text{Mod})$ nimmt die Retentionszeit der Analyte zu.

In Abb. 20 ist $\ln(k)$ für alle Analyte gegen $\phi(\text{Mod})$ aufgetragen. Wie erwartet, sinken die Retentionsfaktoren k bei Erhöhung des Modifiziergehalts kontinuierlich. Für die in Abb. 20 aufgeführten Meßpunkte wurde eine lineare Regression durchgeführt. Die Werte für r^2 der Ausgleichsgeraden betragen für Benzoessäuremethylester 0,9999, für Benzoessäureethylester, Benzoessäurepropylester und Benzoessäurebenzylester 0,9992, und für Benzoessäurebutylester 0,9985. Der Zusammenhang zwischen $\ln(k)$ und $\phi(\text{Mod})$ kann für alle Analyte als linear bezeichnet werden. Abb. 21 zeigt die Abhängigkeit der Trennstufenhöhe N von $\phi(\text{Mod})$ für Benzoessäureethylester und Benzoessäurebutylester. Der Wert von N ist der Mittelwert aus 3 Messungen. Für $\phi(\text{Mod}) = 80\text{-}60\%$ zeigt N praktisch keine Abhängigkeit vom Modifiziergehalt. Bei $\phi(\text{Mod}) = 50\%$ nimmt N für beide Analyte um ca. 10000 ab. Eine vergleichbare Abnahme von N tritt auch bei den übrigen Analyten auf. Diese Daten werden hier nicht gezeigt.

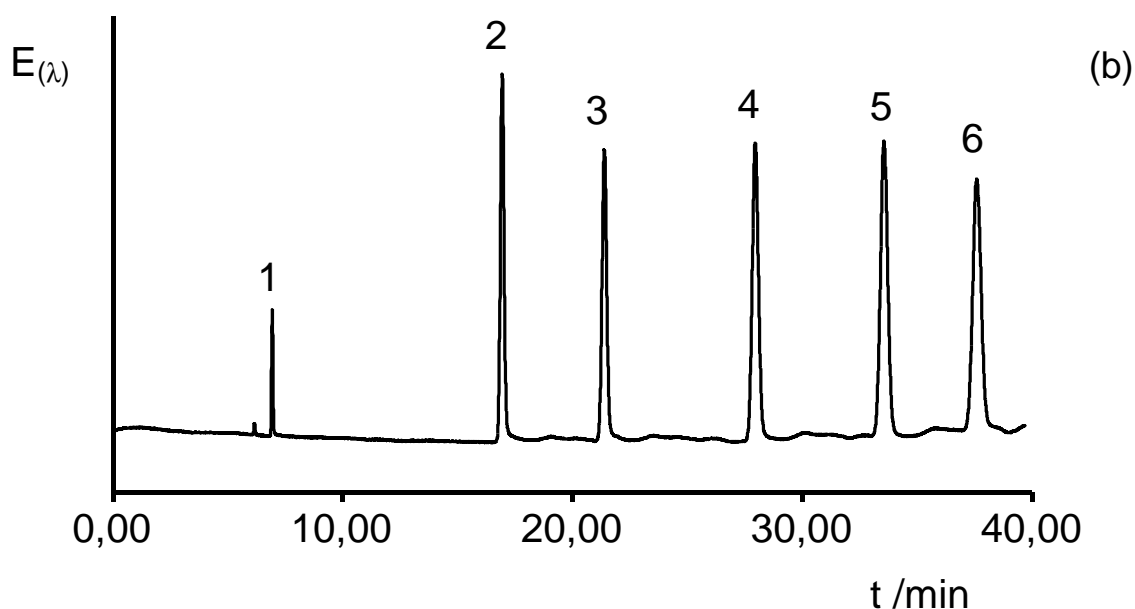
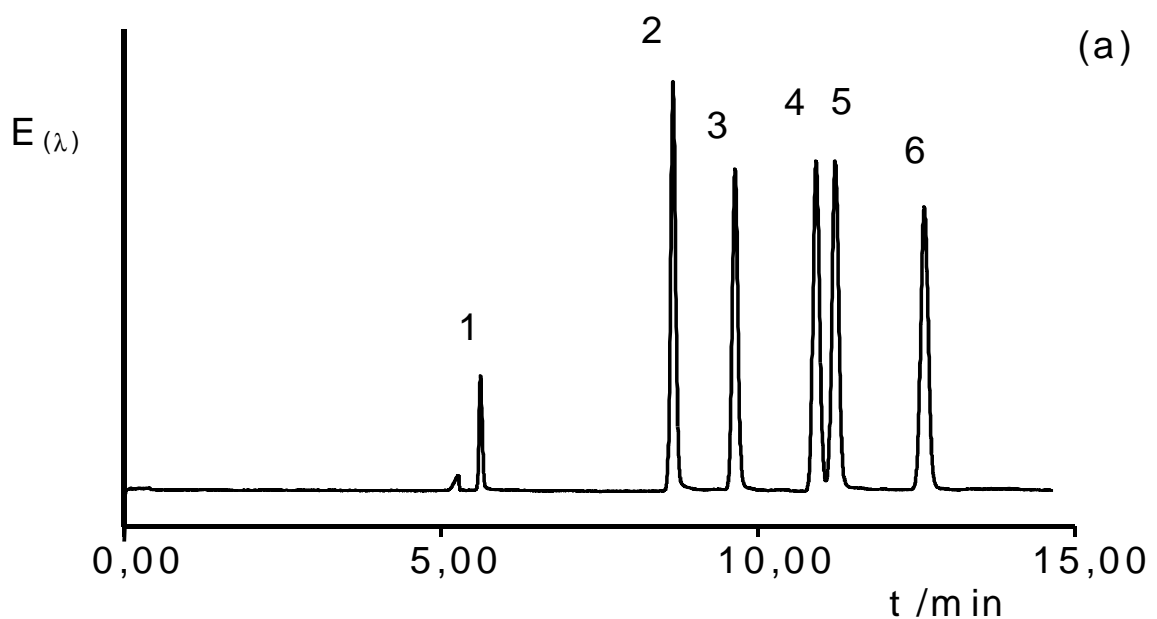


Abb. 19: Chromatogramme der Testmischung aus Benzoesäureestern. Kapillarsäule, 442(390)mm \times 100 μ m I.D., stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \mu$ m, mobile Phase AcCN/Phosphatpuffer, (a) $\phi(\text{Mod}) = 80\%$ v/v, (b) $\phi(\text{Mod}) = 60\%$ v/v, elektrokinetische Probenaufgabe, 2 s bei 8 kV, Trennspannung 25 kV, photometrische In-column-Detektion, $\lambda = 230$ nm, Analyte: 1 = Thioharnstoff, 2 = Benzoesäuremethylester, 3 = Benzoesäureethylester, 4 = Benzoesäurepropylester, 5 = Benzoesäurebenzyl- ester, 6 = Benzoesäurebutylester

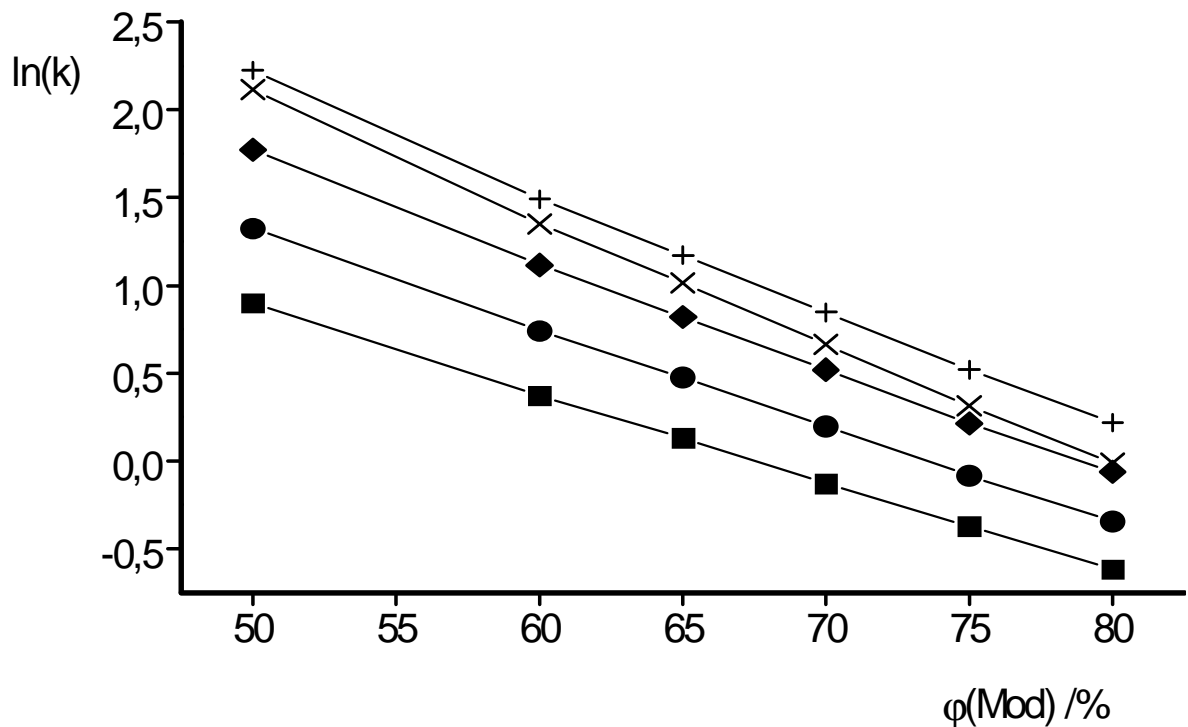


Abb. 20: Auftragung von $\ln(k)$ gegen $\phi(\text{Mod})$. ■ = Benzoessäuremethylester, ● = Benzoessäureethylester, ◆ = Benzoessäurepropylester, × = Benzoessäurebenzylester, + = Benzoessäurebutylester, sonstige Bedingungen siehe Abb. 19

Wie die Standardabweichungen von N beider Analyte zeigen, läßt sich der beobachtete Effekt nicht durch eine Streuung der Meßwerte erklären. Als Grund für die Abnahme von N können folgende Ursachen in Betracht kommen. Die Viskosität der benutzten Mischphase steigt bei Verringerung von $\phi(\text{Mod})$ an [53]. Dadurch kann der C_m -Term der VAN-DEEMTER-Gleichung, infolge der Behinderung der Diffusion der Analytmoleküle zur stationären Phase, erhöht werden [55]. Bei sinkendem Modifiziergehalt wird die unpolare stationäre Phase durch die mobile Phase zunehmend schlechter benetzt. Dadurch kann der Stoffaustausch zwischen mobiler und stationärer Phase behindert werden. Es ist denkbar, daß dieser Effekt ebenfalls zu einer Abnahme von N führt.

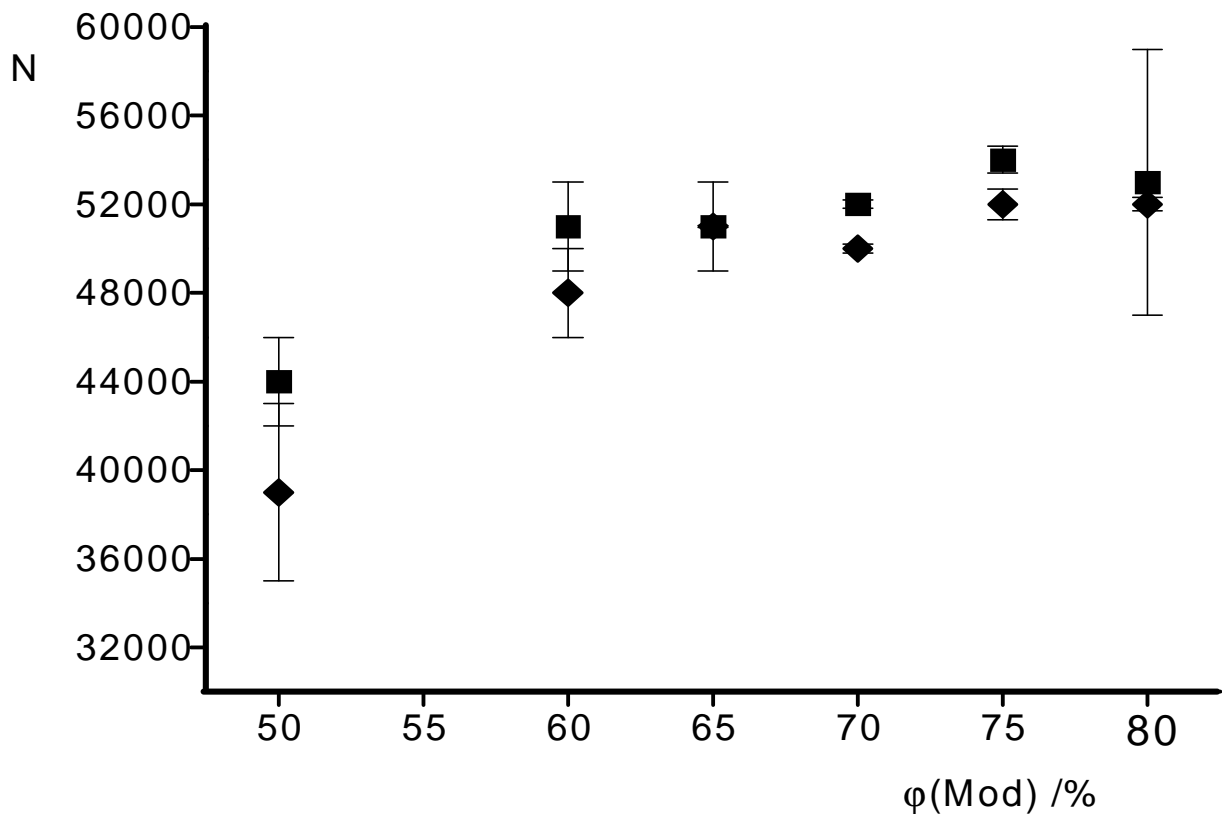


Abb. 21: Auftragung von N gegen $\phi(\text{Mod})$. ■ = Benzoessäureethylester, ◆ = Benzoessäurebutylester, sonstige Bedingungen siehe Abb. 19

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß in der RP-CEC die Variation des Modifiziergehalts auf die Retention ungeladener Analyte den gleichen Einfluß wie in der RP-HPLC hat. Es können daher die gleichen Optimierungsprinzipien angewendet werden, die für die RP-HPLC entwickelt wurden. Unter den vorgestellten Bedingungen nimmt jedoch bei Unterschreitung eines bestimmten Grenzwerts für $\phi(\text{Mod})$ die Effizienz des Systems signifikant ab.

6.4 Auswahl des organischen Modifiers der mobilen Phase

6.4.1 Einführung

Mit der Variation des organischen Modifiers in der mobilen Phase läßt sich in der RP-LC die Selektivität verändern. In der CEC ist der Einfluß des Modifiers auf die Eigenschaften des Trennsystems kaum untersucht. Neben einer Veränderung der Selektivität kann in der CEC mit der Variation des Modifiers auch eine Veränderung der elektroosmotischen Beweglichkeit μ_{eo} erwartet werden, da sich die Dielektrizitätskonstante und die Viskosität der mobilen Phase verändern. Damit beeinflusst die Wahl des Modifiers auch die Analysendauer.

DITTMANN und ROZING trennten ein Testgemisch aus Parabenen und PAH unter Verwendung von AcCN, MeOH und Tetrahydrofuran (THF) als Modifier [10]. Sie beobachteten eine Veränderung der Retentionsfaktoren der Analyte und der Selektivität. Außerdem wurde v_{eo} bei Ersatz von AcCN durch MeOH bzw. THF stark verringert. Für die Verringerung von v_{eo} machten sie die Abnahme des Werts von ϵ_r/η der mobilen Phase und eine Variation des elektrokinetischen Potentials verantwortlich.

Für wäßrige Lösungen von Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO) und Aceton nimmt ϵ_r/η große Werte an [53, 57]. Dies ist notwendig zur Erzielung eines großen Werts für μ_{eo} . Deshalb wurden diese Lösungsmittel als potentielle organische Modifier für die RP-CEC ausgewählt und mit AcCN in Bezug auf ihre Eignung für diese Verwendung verglichen. Aufgrund großer Unterschiede in den Brechungsindizes zwischen der stationären und der mobilen Phase bei Einsatz dieser Lösungsmittel, erscheint das chromatographische Bett jedoch lichtundurchlässig (siehe Abschnitt 4.4, S. 30). Die Experimente mußten daher im OCD-Modus ausgeführt werden. Zur Berechnung von k und v_{eo} wurden die Gl. 9 und 10, S. 6 f., verwendet. $\phi(\text{Mod})$ betrug 80%, v/v. Für AcCN und Aceton wurden auch Messungen bei $\phi(\text{Mod}) = 60\%$, v/v durchgeführt.

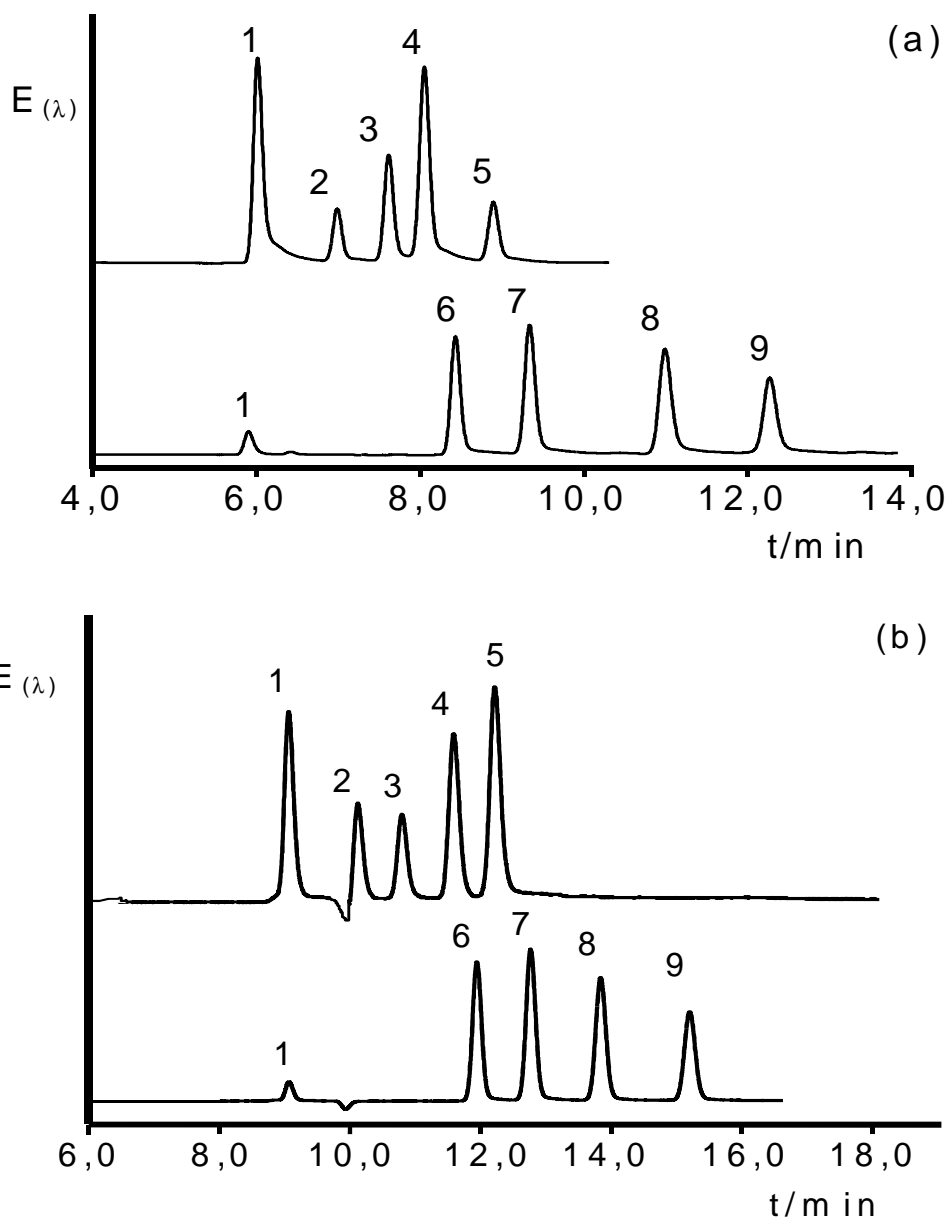


Abb. 22: Trennung von Benzoesäureestern, Amino- und Nitrotoluolen bei Verwendung verschiedener Modifier. Kapillarsäule, $L = 422(365) \text{ mm} \times 150 \text{ } \mu\text{m}$ I.D., stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \text{ } \mu\text{m}$, mobile Phase Modifier/Phosphatpuffer 8:2 v/v, Modifier, (a) AcCN, elektrokin. Probenaufgabe bei 1,9 kV für 3 s, (b) Aceton, elektrokin. Probenaufgabe bei 2,8 kV für 3 s; beide, Trennspannung 25 kV, photometrische On-column Detektion, $\lambda = 250 \text{ nm}$ (AcCN: 230 nm), Analyte: 1 = Thioharnstoff (t_0 -Marker), 2 = *p*-Nitroanilin, 3 = 2-Amino-4-nitrotoluol, 4 = 2,6-Dinitrotoluol, 5 = *p*-Nitrotoluol, 6 = Benzoesäuremethylester, 7 = Benzoesäureethylester, 8 = Benzoesäurebenzylester, 9 = Benzoesäurebutylester

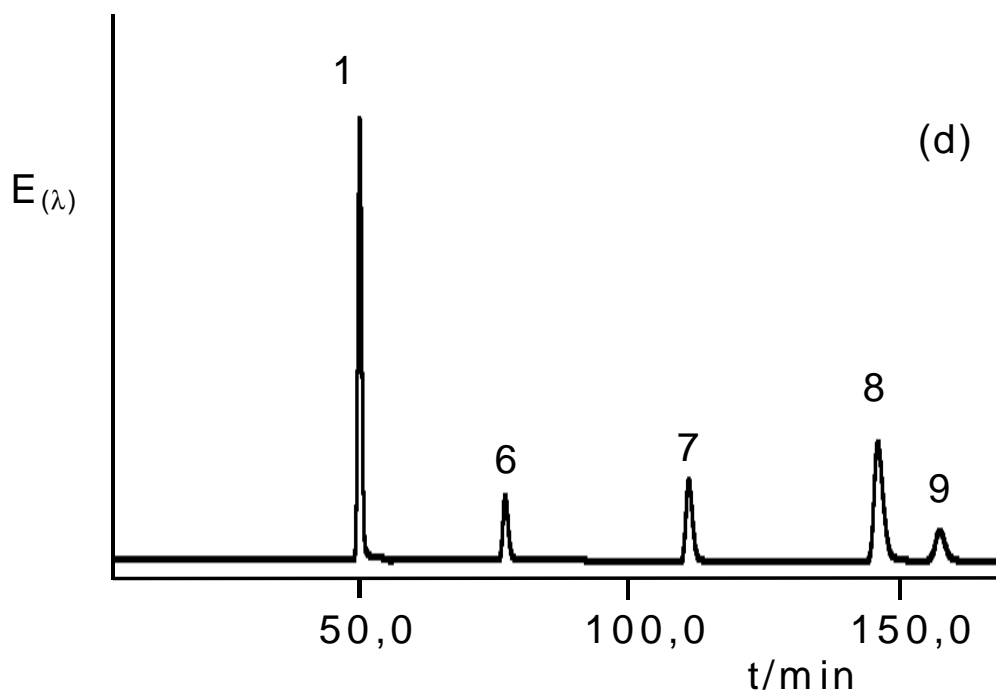
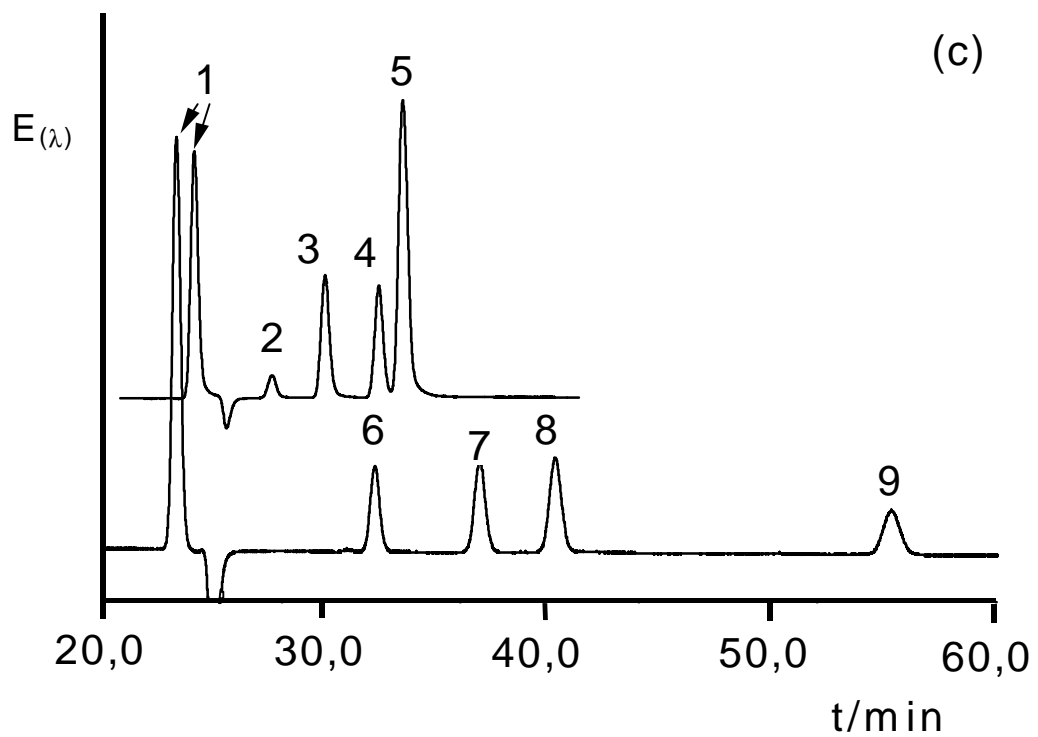


Abb. 22 (fortgesetzt): Modifier, (c) DMF elektrokin. Probenaufgabe bei 3,7 kV für 5 s, (d) DMSO, elektrokin. Probenaufgabe bei 7,2 kV für 5 s

Als Analyte wurden Benzoessäureester, Amino- und Nitrotoluole eingesetzt. Die Probenaufgabebedingungen (U_i , t_i) wurden so gewählt, daß unabhängig von der verwendeten mobilen Phase Probenpfropfen gleicher Länge injiziert wurden. Es wurde für alle Modifier dieselbe Kapillarsäule verwendet. Die Abb. 22 (a) bis (d) zeigen die Chromatogramme der genannten Analyte bei Verwendung der verschiedenen organischen Modifier für $\varphi(\text{Mod}) = 80\%$.

6.4.2 Einfluß des organischen Modifiers auf den elektroosmotischen Fluß

In Tab. 7 werden die nach Gl. 24 und 25, S. 55, aus t_0 berechneten Werte für μ_{eo} bei Verwendung der verschiedenen Modifier verglichen. Die Koeffizienten ε_r/η sind ebenfalls aufgeführt.

Tab. 7 zeigt, daß μ_{eo} bei Verwendung von AcCN als Modifier unabhängig von seinem Volumenanteil in der mobilen Phase besonders hoch ist. Lediglich mit Aceton als Bestandteil der mobilen Phase ist μ_{eo} vergleichbar groß. Mit DMF und DMSO ist μ_{eo} so gering, daß ihre Verwendung als Bestandteil mobiler Phase in der CEC infolge der zu geringen Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase als inakzeptabel erscheint. Die vorgestellten Ergebnisse verweisen auf die besonders gute Eignung des AcCN als Bestandteil mobiler Phasen in der CEC. Von den hier mit AcCN als Modifier verglichenen Lösungsmitteln eignet sich sonst nur noch Aceton als Bestandteil mobiler Phasen in der CEC, da die Analysendauer bei Ersatz von AcCN durch Aceton als Modifier nur geringfügig verlängert wird.

Tab. 7: Vergleich von μ_{eo} und ε_r/η bei Verwendung verschiedener Modifier

Modifier $\varphi(\text{Mod})$	$\mu_{eo} /$ $\text{mm}^2\text{s}^{-1}\text{kV}^{-1}$	$\varepsilon_r (25^\circ \text{C})$	$\eta (25^\circ \text{C}) /$ $10^{-4}\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$	$\varepsilon_r/\eta /$ $10^{-4} \text{m s kg}^{-1}$
AcCN 80%	19,84	44,53 ^a	5,03 ^a	8,90
AcCN 60%	13,83	55,23 ^a	10,50 ^a	5,30
Aceton 80%	13,01	32,80 ^a	11,10 ^a	3,00
Aceton 60%	10,37	43,30 ^a	19,10 ^a	2,30
DMF 80%	5,41	52,10 ^b	18,00 ^c	2,90
DMSO 80%	2,23	64,70 ^a	34,50 ^a	1,90

^a Werte aus [53], ^b Wert aus [57], ^c eigene Messung (Meßbedingungen siehe Anhang), mobile Phase, Modifier/Phosphatpuffer, $\varphi(\text{Mod}):(100-\varphi(\text{Mod}))$, sonstige Bedingungen siehe Abb. 22

In Abb. 23 sind die für die verwendeten mobilen Phasen ermittelten elektroosmotischen Beweglichkeiten μ_{eo} gegen die entsprechenden Quotienten ε_r/η aufgetragen. ε_r/η und μ_{eo} sind nicht eindeutig miteinander korrelierbar. Dies sollte der Fall sein, wenn bei Variation des Modifiers oder seines Anteils in der mobilen Phase ζ konstant bleibt. Besonders für Aceton-haltige mobile Phasen fällt auf, daß im Vergleich zu den übrigen mobilen Phasen μ_{eo} größer ist, als es nach dem Wert für ε_r/η bei Verwendung von Aceton als Modifier erwartet werden kann. Dies belegt, daß bei Variation des Modifiers auch ζ verändert wird [53].

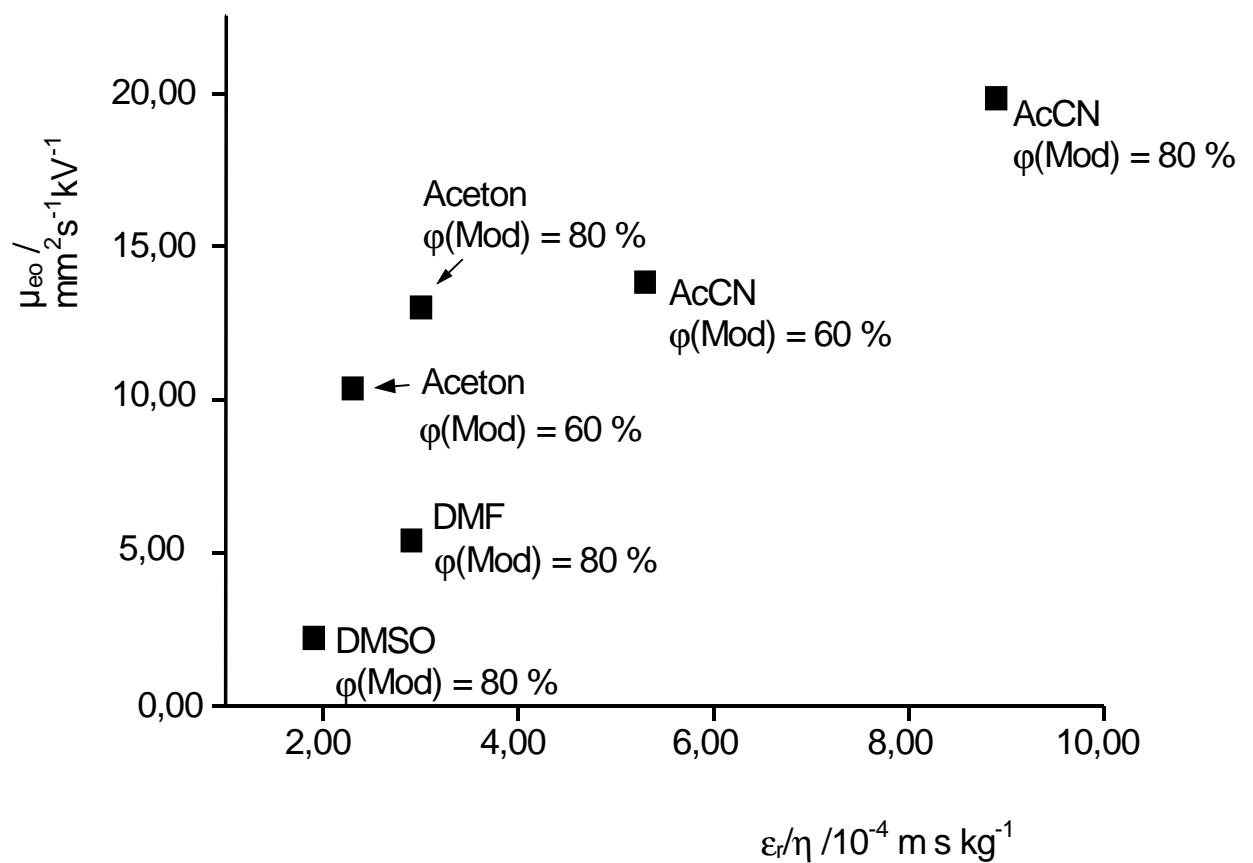


Abb. 23: Auftragung der für die verwendeten mobilen Phasen ermittelten elektroosmotischen Beweglichkeiten μ_{eo} gegen die entsprechenden Quotienten ϵ_r/η . Mobile Phase, Modifier/Phosphatpuffer, $\phi(\text{Mod}):(100-\phi(\text{Mod}))$, sonstige Bedingungen siehe Abb. 22

6.4.3 Einfluß des organischen Modifiers auf die Trenneigenschaften

Die Variation des Modifiers der mobilen Phase führt zu einer Veränderung der Retentionsfaktoren k der untersuchten Analyte und der Selektivitätskoeffizienten α . Tab. 8 gibt die Werte für k bei Verwendung der verschiedenen Modifier wieder. Mit Aceton als Modifier ist k bei gleichem Gehalt des Modifiers in der mobilen Phase generell kleiner wie bei Verwendung von AcCN. Mit DMF ist k , verglichen mit AcCN, für die polaren Nitrotoluole kleiner, für die unpolaren Benzoessäureester größer. Für DMSO als Modifier beobachtet man gegenüber AcCN eine starke Erhöhung von k .

Tab. 9 gibt die Selektivitätsfaktoren α aufeinander folgend eluierter Analyte bei Verwendung der verschiedenen Modifier an. Generell verändert sich die Selektivität des Systems bei Variation des Modifiers und seines Gehalts in der mobilen Phase. Für Aceton kommt es gegenüber AcCN bei gleichem Gehalt des Modifiers in der mobilen Phase zu einer starken Erhöhung der Selektivität für die polaren Nitrotoluole und das Peakpaar 2,6-Dinitrotoluol/Benzoessäuremethylester. Auch für DMSO und DMF zeigt sich für die meisten Peakpaare eine Erhöhung der Selektivität gegenüber AcCN als Modifier. Für das Peakpaar *p*-Nitrotoluol/Benzoessäuremethylester nimmt α bei Aceton und DMF Werte < 1 aufgrund Retentionsumkehr der betroffenen Peaks an. Für AcCN und Aceton als Modifier tritt Retentionsumkehr bei den Peakpaaren Benzoessäuremethylester/2,6-Dinitrotoluol und Benzoessäureethylester/*p*-Nitrotoluol bei Verringerung von $\phi(\text{Mod})$ auf.

Die Abb. 22 zeigt, daß bei Verwendung jedes Modifiers symmetrische, GAUSS-förmige Peaks erhalten wurden. Um den Einfluß des Modifiers auf die Effizienz des Systems zu bestimmen, wurden die Trennstufenzahlen N der Analyte bei Verwendung der mobilen Phasen mit $\phi(\text{Mod}) = 80 \%$, v/v berechnet. Die Probeaufgabebedingungen wurden den unterschiedlichen Werten für v_{eo} bei Verwendung der unterschiedlichen mobilen Phase angepaßt. Dazu wurden Probeaufgabezeit und -spannung so gewählt, daß Probenpfropfen gleicher Länge ($L_1 \approx 0,3 \text{ mm}$) injiziert wurden.

Tab. 8: Retentionsfaktoren k für die untersuchten Analyte bei Variation des Modifiers

Analyt	$\phi(\text{AcCN})/\%$		$\phi(\text{Aceton})/\%$		$\phi(\text{DMSO})/\%$	$\phi(\text{DMF})/\%$
	80	60	80	60	80	80
<i>p</i> -Nitroanilin	0,23	0,53	0,06	0,07	0,57	0,12
2-Amino-4-nitrotoluol	0,37	0,96	0,16	0,39	1,41	0,27
2,6-Dinitrotoluol	0,47	1,52	0,27	0,81	2,27	0,42
Bzs.methylester	0,54	0,98	0,37	0,41	- ^a	0,63
<i>p</i> -Nitrotoluol	0,65	1,94	0,36	1,13	2,55	0,49
Bzs.ethylester	0,75	1,58	0,48	0,86	- ^a	0,92
Bzs.benzylester	1,11	3,60	0,63	2,38	- ^a	1,13
Bzs.butylester	1,39	4,23	0,83	2,85	- ^a	2,07

^a nicht bestimmt, Bzs. = Benzoesäure, mobile Phase, Modifier/Phosphatpuffer, $\phi(\text{Mod}):(100-\phi(\text{Mod}))$, sonstige Bedingungen siehe Abb. 22

Bei der gewählten Probenpfropflänge kann ein signifikanter Beitrag der Probenaufgabe zur Bandenverbreiterung ausgeschlossen werden. In Abb. 24 sind die berechneten Trennstufenzahlen N gegen k aufgetragen. Abb. 24 zeigt, daß die Trennstufenzahlen für die untersuchten Analyte bei Verwendung der verschiedenen Modifier stark voneinander abweichen. Für die unpolaren Benzoesäureester ist N bei Verwendung von DMSO und Aceton als Modifier gegenüber N bei Verwendung von DMF und AcCN signifikant erhöht. Die niedrigsten Trennstufenzahlen werden für die Benzoesäureester bei Verwendung von AcCN als Modifier erhalten. Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden mit derselben Kapillarsäule durchgeführt. Unterschiedliche Trenneigenschaften des chromatographischen Systems aufgrund der Kapillarsäule als Ursache für die Unter-

schiede in den erreichten Trennstufenhöhen können daher ausgeschlossen werden.

Tab. 9: Selektivitätsfaktoren α für die untersuchten Analyte bei Variation des Modifiers

Peakpaar	$\varphi(\text{AcCN})/\%$		$\varphi(\text{Aceton})/\%$		$\varphi(\text{DMSO})/\%$	$\varphi(\text{DMF})/\%$
	80	60	80	60	80	80
2,3	1,59	1,80	2,54	5,44	2,46	2,19
3,4	1,26	1,59	1,73	2,08	1,61	1,55
4,5 (4,6 ^b)	1,17	0,64	1,34	0,50	1,12	1,50
5,6	1,20	1,98	0,99	2,77	- ^a	0,77
6,7	1,14	0,82	1,33	0,76	- ^a	1,89
7,8	1,49	2,28	1,31	2,76	- ^a	1,23
8,9	1,25	1,17	1,30	1,20	- ^a	1,82

^a nicht bestimmt, ^b für DMSO, 2 = *p*-Nitroanilin, 3 = 2-Amino-4-nitrotoluol, 4 = 2,6-Dinitrotoluol, 5 = Benzoessäuremethylester, 6 = *p*-Nitrotoluol, 7 = Benzoessäureethylester, 8 = Benzoessäurebenzylester, 9 = Benzoessäurebutylester, mobile Phase, Modifier/Phosphatpuffer, $\varphi(\text{Mod}):(100-\varphi(\text{Mod}))$, sonstige Bedingungen siehe Abb. 22

Die höchsten Trennstufenzahlen wurden u.a. mit DMSO als Modifier erhalten. Die Experimente mit DMSO wurden am Ende der betrachteten Versuchsreihe durchgeführt. Wäre ein Alterungseffekt der Kapillarsäule wirksam, sollten die Trennstufenzahlen bei den Experimenten mit DMSO als Modifier abnehmen. Die Abhängigkeit von N muß also auf die Zusammensetzung der mobilen Phase zurückzuführen sein.

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß sich in der CEC die Retention der Analyte und die Selektivität des chromatographischen Systems durch die Wahl des organischen Modifiers der mobilen Phase beeinflussen lassen. Dabei wird aber meist v_{eo} so stark verringert, daß es zu einer inakzeptablen Verlängerung der Analysendauer kommt. Aufgrund des großen Werts für μ_{eo} ist AcCN als Modifier in der CEC besonders geeignet.

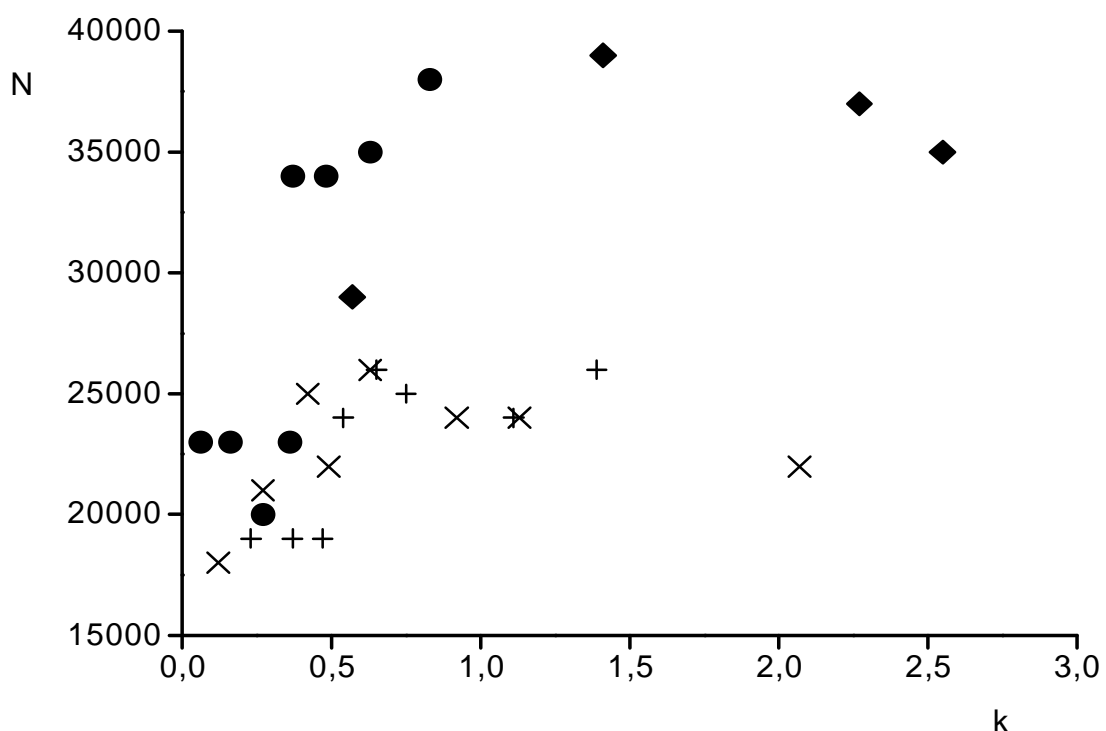


Abb. 24: Auftragung der Trennstufenzahlen N der benutzten Analyte gegen k bei Verwendung verschiedener Modifier. + = AcCN, ● = Aceton, X = DMF, ◆ = DMSO, mobile Phase, Modifier/Phosphatpuffer, 8:2 v/v, sonstige Bedingungen siehe Abb. 22

6.5 Ternäre mobile Phasen

In Abschnitt 6.4 wurde gezeigt, daß sich die Selektivität in der CEC durch die Variation des organischen Modifiers der mobilen Phase beeinflussen läßt. Dabei wird allerdings meist v_{eo} stark verringert. Deshalb wurde untersucht, inwieweit sich die Selektivität bei Verwendung mobiler Phasen aus AcCN und Phosphatpuffer durch Zugabe eines weiteren organischen Modifiers beeinflussen läßt, ohne eine wesentliche Verringerung von v_{eo} in Kauf nehmen zu müssen. Als tertiäre Komponenten wurden DMSO, DMF und THF ausgewählt. Der Volumenanteil der tertiären Komponente in der mobilen Phase betrug 20 %, der Volumenanteil des Phosphatpuffers ebenfalls 20 %. Für alle Messungen wurde dieselbe Kapillarsäule verwendet. Als Testmischung wurde ein Gemisch aus Benzoesäureestern, PAH, und Nitro- und Aminoderivaten des Toluols eingesetzt. Die Probenaufgabebedingungen wurden bei allen mobilen Phasen konstant gehalten.

Die Abb. 25 (a) bis (d) zeigen die Chromatogramme, die bei Verwendung einer binären mobilen Phase aus AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v und unter Zugabe von DMSO, DMF und THF als tertiärer Komponente erhalten wurden. In Tab. 10 sind die Werte für k und die daraus berechneten Werte für α für aufeinanderfolgend eluierte Analyte aufgeführt. Der Zusatz von DMF und DMSO als tertiäre Komponenten zur binären mobilen Phase führt zu einer teilweise drastischen Veränderung der Selektivität. Es kommt gegenüber der binären mobilen Phase zu folgenden Verbesserungen: Die Peakpaare 2-Amino-4-nitrotoluol/2,4,6-Trinitrotoluol und Acenaphthen/Benzoesäure-*i*-pentylester werden bis zur Basislinie getrennt. Für die Peakpaare *p*-Nitrotoluol/Phenol und 2,4-Dinitrotoluol/2,6-Dinitrotoluol steigt α soweit, so daß Doppelpeaks mit zwei Maxima erkennbar werden. Ferner kommt es bei Verwendung von DMSO für Benzoesäurepropylester und Naphthalin zu einer Umkehr der Retentionsreihenfolge. Bei Verwendung von DMF werden beide Substanzen koeluiert.

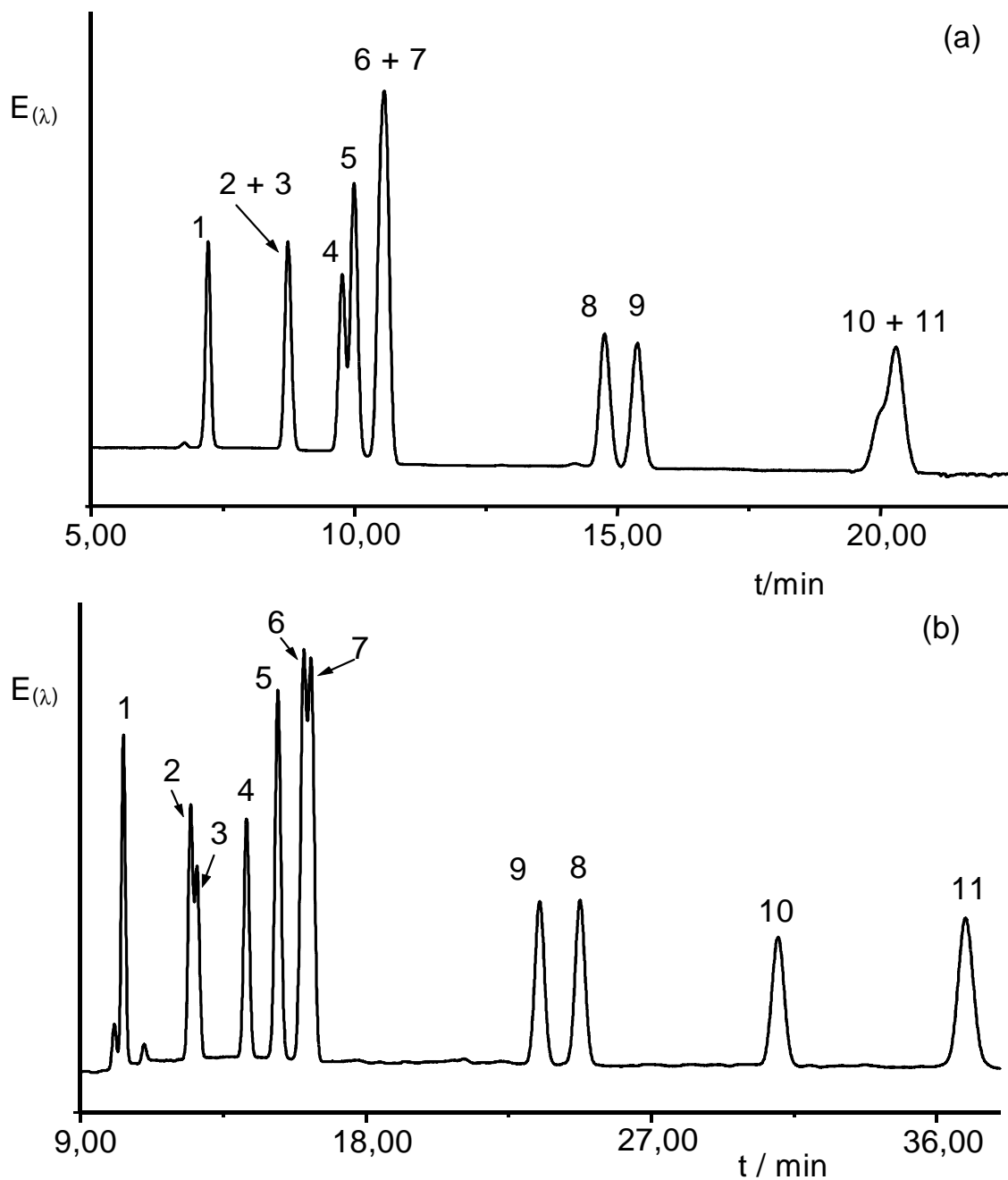


Abb. 25: Trennung der Testmischung mit (a) AcCN/Phosphatpuffer 8:2 v/v und (b) AcCN/DMSO/Phosphatpuffer 6:2:2 v/v als mobiler Phase. Kapillarsäule, 357(302) mm \times 150 μ m I.D., stat. Phase Nucleosil 100-3 ODS, d_p = 3 μ m, Trennspannung 20 kV, Probenaufgabe 2 kV für 4 s, photometr. In-column Det., λ = 250 nm, Analyte: 1 = Thioharnstoff, 2 = *p*-Nitroanilin, 3 = Phenol, 4 = 2-Amino-4-nitrotoluol, 5 = 2,4,6-Trinitrotoluol, 6 = 2,6-Dinitrotoluol, 7 = 2,4-Dinitrotoluol, 8 = Benzoesäurepropylester, 9 = Naphthalin, 10 = Ace-naphthen, 11 = Benzoesäure-*i*-pentylester

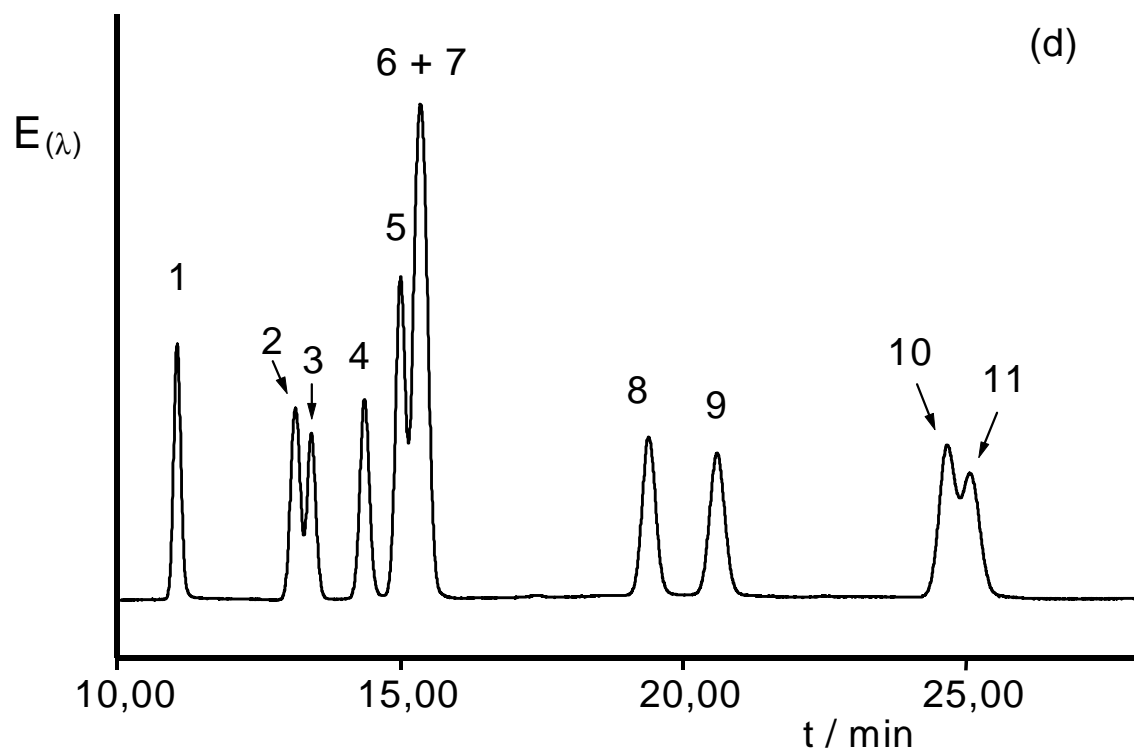
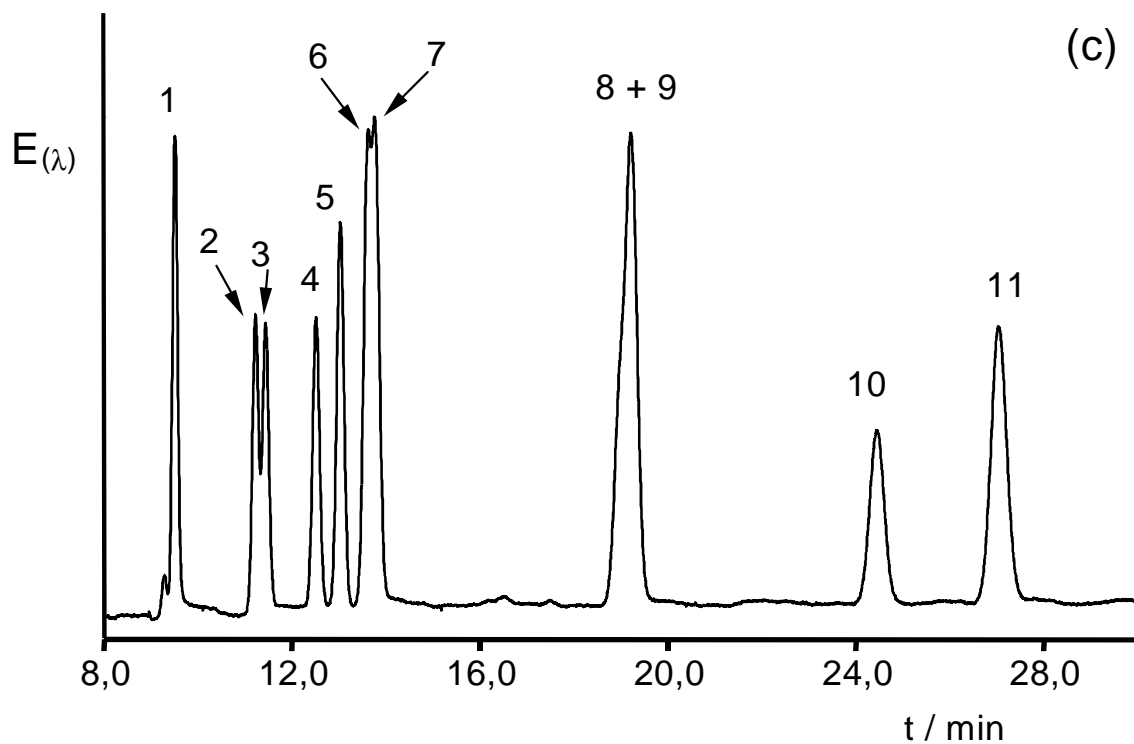


Abb. 25 (fortgesetzt): Trennung der Testmischung mit (c) AcCN/DMF/Phosphatpuffer 6:2:2 v/v und (d) AcCN/THF/Phosphatpuffer 6:2:2 v/v als mobiler Phase

Bei Einsatz von THF als tertiäre Komponente wurde die Selektivität des chromatographischen Systems mit Ausnahme für das Peakpaar *p*-Nitrotoluol/Phenol nicht wesentlich verbessert.

Tab. 10: Vergleich der Retentionsfaktoren k und der Selektivität α aufeinander folgend eluierter Analyte bei Verwendung binärer und ternärer mobiler Phasen

	(a)		(b)		(c)		(d)	
	k	α	k	α	k	α	k	α
<i>p</i> -Nitroanilin	0,21	1,00	0,21	1,05	0,18	1,12	0,19	1,11
Phenol	0,21	1,67	0,22	1,73	0,20	1,60	0,21	1,43
2-Amino-4-nitrotoluol	0,35	1,03	0,38	1,24	0,32	1,16	0,30	1,20
2,4,6-Trinitrotoluol	0,38	1,21	0,47	1,17	0,37	1,16	0,36	1,08
2,6-Dinitrotoluol	0,46	1,00	0,55	1,04	0,43	1,04	0,39	1,00
2,4-Dinitrotoluol	0,46	2,26	0,57	2,44	0,45	2,27	0,39	1,92
Benzoessäurepropylester	1,04	1,09	1,39	0,91	1,02	1,00	0,75	1,15
Naphthalin	1,13	1,60	1,27	1,57	1,02	1,54	0,86	1,43
Acenaphthen	1,81	1,00	1,99	1,27	1,57	1,17	1,23	1,03
Benzoessäure- <i>i</i> -pentylester	1,81	-	2,56	-	1,84	-	1,27	-

(a) AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v, (b) AcCN/Phosphatpuffer/DMSO 6:2:2, v/v, (c) AcCN/Phosphatpuffer/DMF 6:2:2, v/v, (d) AcCN/Phosphatpuffer/THF 6:2:2, v/v, Experimentelle Bedingungen siehe Abb. 25

Tab. 11 vergleicht die aus t_0 berechneten Werte für v_{eo} und μ_{eo} der benutzten ternären mobilen Phasen mit denen der binären mobilen Phase aus AcCN und Phosphatpuffer. Die Werte für v_{eo} und μ_{eo} der ternären mobilen Phasen sind bis auf die Werte für die THF-haltige ternäre mobile Phase gegenüber denen der binären mobilen Phase nur unwesentlich verringert.

Tab. 11: Vergleich von v_{eo} und μ_{eo} bei Verwendung binärer und tertiärer mobiler Phasen

mobile Phase	$v_{eo} / \text{mm s}^{-1}$	$\mu_{eo} / \text{mm}^2 \text{s}^{-1} \text{kV}^{-1}$
AcCN/Phosphatpuffer 8:2, v/v	0,69	12,27
AcCN/DMSO/Phosphatpuffer 6:2:2, v/v	0,53	9,46
AcCN/DMF/Phosphatpuffer 6:2:2, v/v	0,53	9,46
AcCN/THF/Phosphatpuffer 6:2:2, v/v	0,46	6,87

Experimentelle Bedingungen siehe Abb. 25

Für die verwendeten ternären mobilen Phasen wurden die Trennstufenhöhen N der Analyte aus t_r und $w_{1/2}$ der Peaks berechnet. Gegenüber den Werten von N für die mobile Phase aus AcCN und Phosphatpuffer (8:2 v/v) wird N bei den ternären mobilen Phasen nicht verringert. N liegt in allen Fällen zwischen 25000 und 30000.

Der Einsatz ternärer mobiler Phasen in der CEC gestattet eine gezielte Beeinflussung der Selektivität. Damit lassen sich Trennungen komplexer Analytgemische gezielt verbessern. Gleichzeitig wird die Analysendauer gegenüber den üblichen mobilen Phasen aus AcCN und einer wässrigen Pufferlösung oft nur unwesentlich erhöht.

7 Einsatz von Fließmittelgradienten in der Kapillar-Elektrochromatographie

7.1 Vorteile der Gradientenelution

In der HPLC werden Fließmittelgradienten zur Optimierung von Trennungen komplexer Analytgemische eingesetzt. Bei dieser Methode wird die Elutionsstärke der mobilen Phase während der Analyse vergrößert. Dadurch wird die Retention spät eluierter Analyte verringert. Es werden kürzere Analysezeiten bei ausreichender Trennung der Komponenten des Stoffgemischs erzielt [55]. Auch in der CEC verspricht der Einsatz dieser Technik eine erhebliche Steigerung ihrer Leistungsfähigkeit.

Die einfachste Möglichkeit zur Realisierung von Fließmittelgradienten in der CEC stellen Stufengradienten dar. Zur Bereitstellung eines Stufengradienten wird die Entwicklung des Chromatogramms mit einem Fließmittel A begonnen. Nach einer bestimmten Zeit wird die Entwicklung des Chromatogramms durch Abschalten der Trennungsspannung angehalten und Fließmittel A gegen ein Fließmittel B anderer Zusammensetzung getauscht. Dann wird die Entwicklung des Chromatogramms mit Fließmittel B als mobiler Phase beendet. EUEBY et al. [45] trennten durch Anwendung eines Stufengradienten polare und unpolare Diuretika. Als stationäre Phase diente ODS-Silikagel. Als mobile Phasen wurden wässrige Pufferlösungen mit verschiedenem AcCN-Gehalt verwendet.

Mit der oben vorgestellten Technik lassen sich lineare, konkave oder konvexe Fließmittelgradienten nicht realisieren. Dazu ist es notwendig, die Fließmittelzusammensetzung während der Analyse kontinuierlich ändern zu können. YAN et al. [29] erreichten dies durch Förderung zweier mobiler Phasen unterschiedlicher Zusammensetzung durch den elektroosmotischen Effekt. Dazu koppelten sie zwei ungepackte Quarzglas kapillaren an ein T-Stück. Die Fließmittelzusammensetzung wurde gesteuert, indem an jede zuführende Kapillare eine unabhängig voneinander wählbare Spannung angelegt wurde. Die Kapillarsäule war mit dem T-Stück gekoppelt. Sie mußte zur Probenaufgabe vom T-Stück abmontiert werden. Nach

Eintauchen der Kapillarsäule in die Probenlösung erfolgte die Probenaufgabe elektrokinetisch. Dieser komplizierte Vorgang macht eine Automatisierung des Systems schwierig. Ein weiterer Nachteil ist, daß verschiedene mobile Phasen eine unterschiedliche elektroosmotische Mobilität haben. Die Steuerung der Fließmittelzusammensetzung durch den EOF ist daher sehr stark an spezielle experimentelle Bedingungen gebunden und kann nur mit erheblichem Aufwand reproduzierbar gestaltet werden.

Die genannten Probleme lassen sich durch Verwendung einer HPLC-Pumpe zur Gradientenförderung und eines HPLC-Injektors zur Probenaufgabe vermeiden. Durch die im Vergleich zu den Flußraten in der CEC zu hohen Flußraten der meisten HPLC-Pumpen ist ein Teilen des Fließmittelstroms (Flow-splitting) unvermeidlich. Zum Schutz der HPLC-Pumpe vor der an der Kapillarsäule anliegenden Hochspannung müssen sämtliche Verbindungen zwischen Pumpe und Kapillarsäule aus nichtleitenden Materialien hergestellt werden. Zur Vermeidung elektrischer Überschläge müssen diese Verbindungen eine hinreichende Länge haben, wodurch Totvolumina unvermeidlich werden. Die Verwendung von HPLC-Bauteilen eröffnet der CEC aber auch neue Möglichkeiten. Die Probenaufgabe wird vereinfacht, da der Austausch des Gefäßes mit der mobilen Phase durch das Probengefäß zur Probenaufgabe entfällt. Dies erleichtert die Automation der CEC und etablierte HPLC-Verfahren, wie, z. B. Heart-cutting [55] und mehrdimensionale Chromatographie, werden für die CEC zugänglich. Auch ist das durch die Probenschleife der Injektoren vorgegebene Probenvolumen meist kleiner als das Volumen der kleinsten Probengefäße, wie sie bei der sonst in der CEC üblichen elektrokinetischen Probenaufgabe verwendet werden. So reichen kleinere Probenvolumina aus.

BEHNKE und BAYER [58] koppelten eine HPLC-Pumpe mit einer modularen CE-Apparatur über ein selbst hergestelltes Interface. Sie betrieben die Anlage im μ -HPLC-Modus und im CEC-Modus. Sowohl bei isokratischer Elution, als auch bei Anwendung eines Fließmittelgradienten stellten sie bei der Trennung von Oligonucleotiden eine Steigerung der Trennleistung im CEC-Modus gegenüber der μ -HPLC fest. Der Antrieb der mobilen

Phase erfolgte dabei mehr druckgetrieben als elektroosmotisch. Damit gehen die Vorteile des Plug-flow weitgehend verloren.

TAYLOR und TEALE [21] konnten bei der Kopplung der CEC mit einer HPLC-Pumpe den druckgetriebenen Fluß weitgehend unterdrücken. Der Flow-split erfolgte durch ein T-Stück, in das die Kapillarsäule direkt eingeschraubt war. Die Probe wurde durch einen Autosampler in das System eingebracht. Durch die am T-Stück anliegende konstante Spannung wurden Probe und mobile Phase durch den EOF in die Kapillarsäule befördert. Infolge der hohen Spannung (25 kV) kann man von einem Beitrag der Probenaufgabe zur instrumentellen Bandenverbreiterung bei diesem Verfahren ausgehen. Ein weiterer Nachteil war die große Gradientenverzögerung infolge zu hoher Totvolumina. Die Detektion erfolgte photometrisch und massenspektrometrisch. Mit diesem System wurden mehrere Corticosteroide in Pferdeurin quantifiziert. Das Ergebnis wurde mit dem Ergebnis eines validierten HPLC-MS Verfahrens verglichen. Das CEC-MS Verfahren erwies sich als geeignet für die beschriebene Problemstellung [59].

Auch im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Gradientenapparatur entwickelt werden. Zur Fließmittelförderung wurde eine HPLC-Pumpe, zum Einbringen der Probe in das System ein HPLC-Injektor benutzt. Die Effizienz der CEC sollte erhalten bleiben. Dazu sollte der druckgetriebene Anteil des Flusses der mobilen Phase weitgehend unterdrückt und die Probe elektrokinetisch in die Kapillarsäule befördert werden. Um auch den geringen Lösungsmittelverbrauch der CEC zu erhalten, sollte die Gradientenförderung bei möglichst kleiner Flußrate erfolgen. Die Anlage sollte dazu ein möglichst geringes Totvolumen aufweisen.

7.2 Aufbau der Gradientenapparatur

Kernstück der Gradientenapparatur ist eine Niederdruckgradienten-Pumpe LC-10 AD (Shimadzu). Die Pumpe ermöglicht Flußraten von 0,001-10 mL/min. Im Gradientenbetrieb sind Flußraten von 0,1-10 mL/min nutzbar. Eigene Versuche ergaben, daß die Pumpe Gradienten aber nur bei Flußraten $\geq 0,2$ mL/min wie programmiert liefert. Deshalb wurden sämtliche Versuche mit der Gradientenapparatur bei einer Flußrate von 0,2 mL/min durchgeführt. Die Pumpe verfügt über eine statische Mischkammer mit einem Volumen von wahlweise 0,5, 1,7 und 2,6 mL. Um das Totvolumen möglichst gering zu halten, wurde die 0,5 mL-Mischkammer verwendet.

Als Injektor wurde ein Ventil Cheminert C1W (Valco) benutzt. Das Ventil ist ein 6-Wege-Ventil mit 2 Schaltpositionen (Probe laden - Probe injizieren) und externer Probenschleife. Es wurden Probenschleifen mit 1 und 2 μ L Volumen benutzt. Die Probenschleifen wurden aus PEEK-Kapillaren, I.D. = 130 μ m, selbst hergestellt. Die Bohrungen des Ventils haben einen Durchmesser von 0,25 mm. Der Antrieb des Injektors erfolgt manuell.

Zum Flow-split wurde ein Edelstahl-T-Stück (Valco) verwendet. Das T-Stück hat eine Bohrung von 0,75 mm. Es dient gleichzeitig als hochspannungsseitige Elektrode. Abb. 26 zeigt schematisch den Aufbau der Apparatur. Der Injektor und das T-Stück sind zum Schutz vor der am T-Stück anliegenden Hochspannung in einen Sicherungskasten aus Plexiglas eingebaut. Der Injektor ist wie in der HPLC üblich geschaltet. Die mobile Phase wird von der Pumpe über eine PEEK-Kapillare, L = 40 cm, I.D. = 130 μ m, zum Injektor befördert. Die Länge der Kapillare ist notwendig, um die Pumpe vor der am T-Stück anliegenden Hochspannung zu schützen. Die Pumpe wurde zusätzlich geerdet. Um das Totvolumen klein zu halten, wurde der I.D. der Kapillare möglichst klein gewählt. Zur Verbindung des Injektors mit dem T-Stück wurde eine PEEK-Kapillare, L = 30 cm, I.D. = 750 μ m gewählt. Die Länge der Kapillare dient dem Schutz des Injektors vor der Hochspannung. Der Injektor ist zusätzlich geerdet.

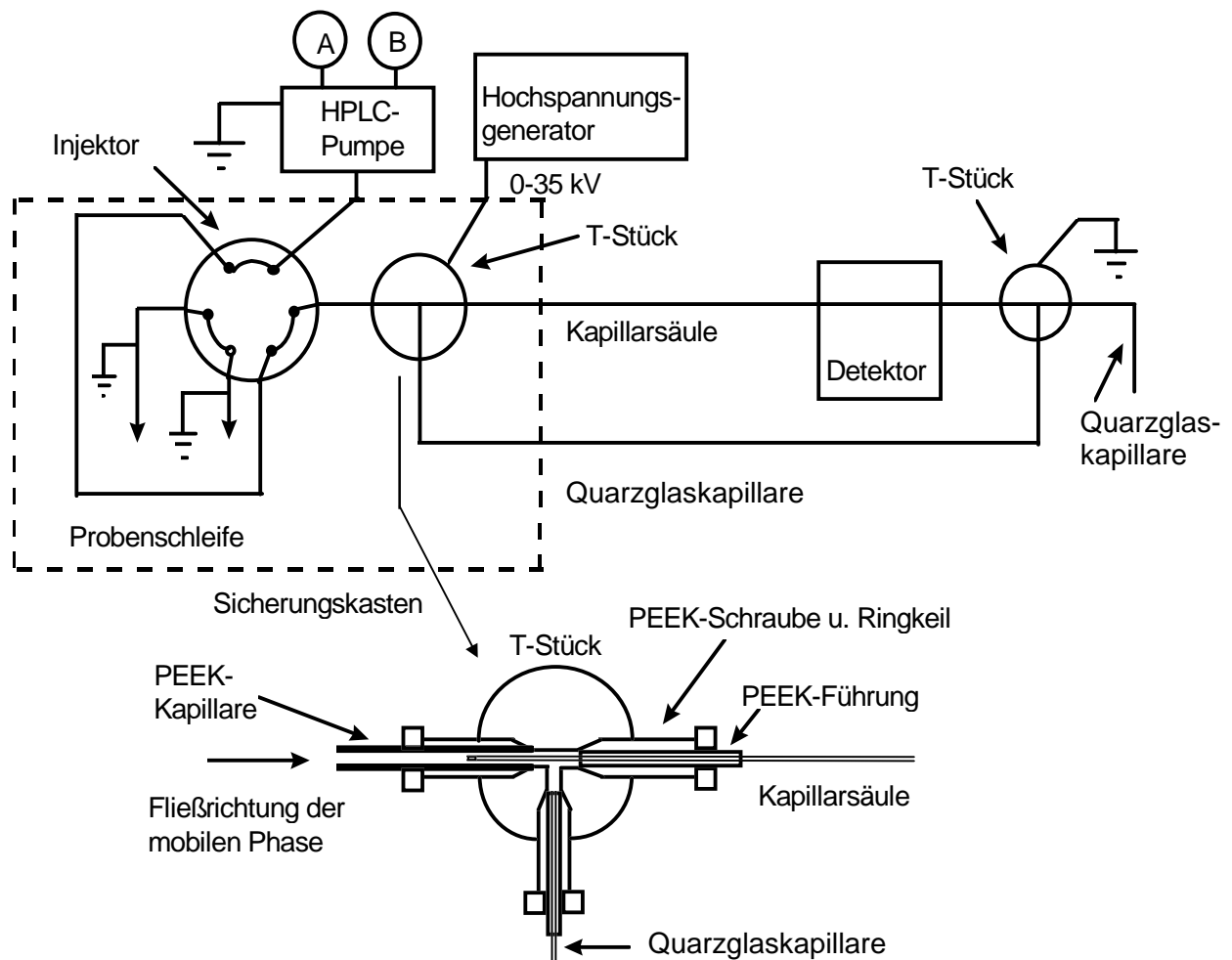


Abb. 26: Schematische Darstellung der Gradientenapparatur

Der große I.D. der Kapillare ist notwendig, um die Kapillarsäule, wie in Abb. 26 dargestellt, vor dem Split-Punkt in den Strom der mobilen Phase eintauchen zu lassen. So ist sichergestellt, daß Probe und mobile Phase den Kopf der Kapillarsäule passieren. Ein Teil der Probe und der mobilen Phase werden durch den EOF in die Kapillarsäule befördert. Der übrige Teil der Probe und der mobilen Phase werden durch eine Quarzglaskapillare, $L = 150 \text{ cm}$, $\text{I.D.} = 75 \text{ }\mu\text{m}$ abgeführt. Der Strom durch diese Kapillare und durch die Kapillarsäule werden hinter dem Detektor durch ein zweites Edelstahl-T-Stück wieder vereint. Dieses T-Stück ist geerdet. Am dritten Ausgang dieses T-Stücks ist eine Quarzglaskapillare, $L = 50 \text{ cm}$, $\text{I.D.} = 75 \text{ }\mu\text{m}$ angeschlossen. Durch diese Kapillare wird am detektorseitigen Ende der Kapillarsäule ein Rückdruck erzeugt, um den Anteil des

druckgetriebenen Flusses durch die Kapillarsäule möglichst klein zu halten. Als Kapillarsäule wurden solche mit einem I.D. = 100 μ m und L = 35-40 cm verwendet. Die Kapillarsäule ist nicht thermostatisiert. Für sämtliche Verschraubungen der Quarzglaskapillaren und der Kapillarsäule werden PEEK-Fingertight-Fittings mit PEEK-Führungsröhrchen für Quarzglaskapillaren (Upchurch Scientific) verwendet. Als Detektor wurde ein für die CE konstruierter UV/Vis-Detektor (Spectra 100, Thermoseparation Products) verwendet.

7.3 Funktionsüberprüfung der Gradientenapparatur

7.3.1 Durchführung der Probenaufgabe

Um die in der CEC geforderten kleinen Probenpropflängen zu erhalten, sollte die Probenaufgabe auch bei der Gradientenapparatur elektrokinetisch erfolgen. Zum Laden der Probe wird die Hochspannung abgeschaltet. Nach dem Laden der Probe wird der Injektor auf die Injektionsposition gestellt und die Hochspannung angeschaltet. Die Probe wird durch die Pumpe mit dem Strom der mobilen Phase zur Kapillarsäule transportiert und umfließt den Säulenkopf. Durch die am T-Stück anliegende Hochspannung wird ein Aliquot der vorbeiströmenden Probe injiziert. Zunächst wurde bei konstanter Flußrate (0,2 mL/min, p = 40 bar) und konstanter Spannung (25 kV) gearbeitet. Die Länge des in die Kapillarsäule injizierten Probenpropfs ist bei diesem Vorgehen u. a. durch die Zeit bestimmt, die der durch die Pumpe herantransportierte Probenpropf benötigt, um den Säulenkopf zu passieren. Mit Variation der Flußrate zu Beginn der Analyse sollte sich so die Probenpropflänge steuern lassen.

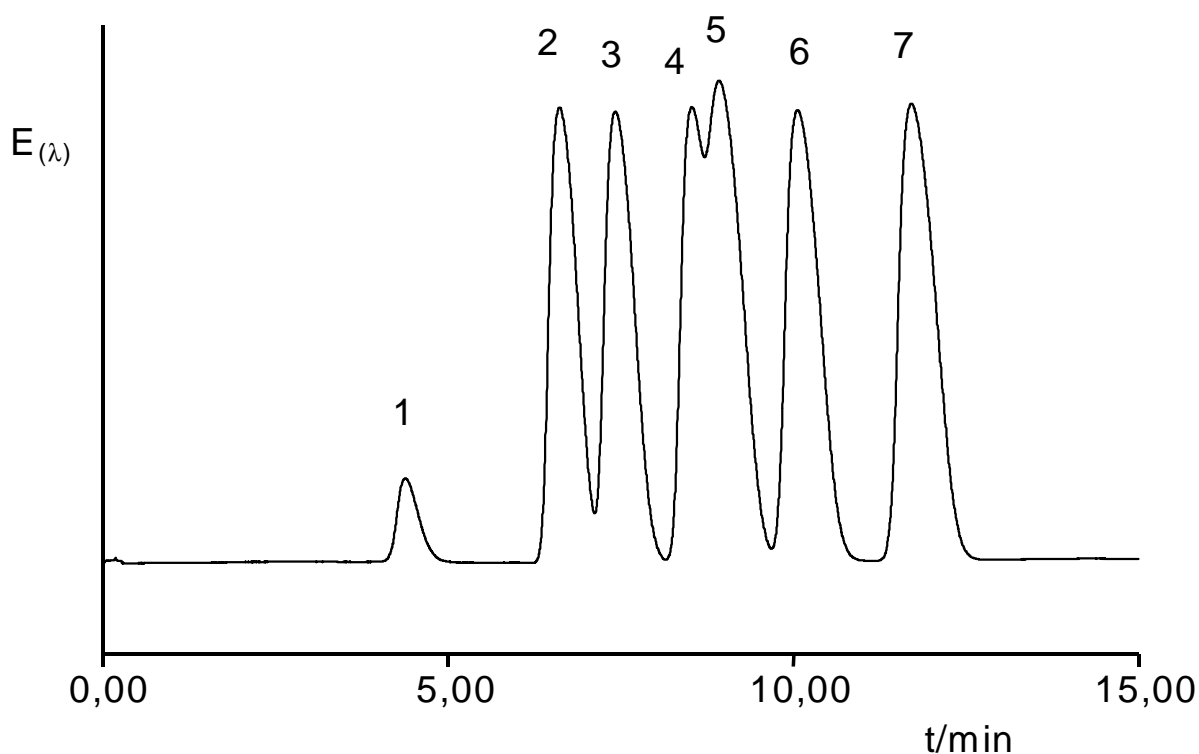


Abb. 27: Isokratische Trennung von Benzoesäureestern mit der Gradientenapparatur. Kapillarsäule, $L = 330(283)\text{mm} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ I.D., stat. Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3\text{ }\mu\text{m}$, mob. Phase AcCN/Phosphatpuffer ($c = 5\text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$), 8:2 v/v, Probenaufgabe und Trennung bei $F = 0,2\text{ mL/min}$, $p = 40\text{ bar}$, $U = 25\text{ kV}$, photometr. In-column-Det., $\lambda = 230\text{ nm}$, Analyte, 1 = Thioharnstoff, 2 = Benzoesäuremethylester, 3 = Benzoesäureethylester, 4 = Benzoesäurepropylester, 5 = Benzoesäurebenzylester, 6 = Benzoesäurebutylester, 7 = Benzoesäure-*i*-pentylester

Zum Testen dieses Verfahrens wurde ein Gemisch verschiedener Benzoesäureester wie beschrieben injiziert und isokratisch getrennt. Abb. 27 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Peaks sind infolge zu großer Länge L_i des injizierten Probenpfropfs stark verbreitert. Die Halbwertsbreiten $w_{1/2}$ betragen 0,3-0,6 min. Bei vergleichbaren Trennungen derselben Analyte mit der in dieser Arbeit vorgestellten Apparatur für isokratische CEC und herkömmlicher elektrokinetischer Probenaufgabe unter ähnlichen Bedingungen (mobile/stationäre Phase, v_{eo}) sind die Werte für

$w_{1/2}$ um einen Faktor 4 - 5 kleiner. Die mit dem vorgestellten Verfahren injizierten Probenpfropfen sind also viel zu lang.

Um L_i zu senken, wurde die Flußrate F auf 0,3 mL/min erhöht. Dadurch sollte der Probenpfropf schneller den Säulenkopf passieren und so die Injektionszeit gesenkt werden. Ferner wurde U zu Beginn der Trennung auf 1 kV gestellt, um nur einen langsamen EOF zu erhalten. Dadurch sollte L_i weiter reduziert werden. Bei $F = 0,3$ mL/min benötigt der Probenpfropf vom Injektor zum aufgabeseitigem T-Stück 0,45 min (Berechnung siehe 7.3.2, S. 98). Um sicherzustellen, daß der Probenpfropf den Säulenkopf unter den gewählten Probenaufgabebedingungen (F , U) passiert, wurden diese für 1 min gehalten. Danach wurde F auf 0,2 mL/min gesenkt und U auf 25 kV erhöht. Das so geänderte Probenaufgabeverfahren wurde wie oben beschrieben getestet. L_i konnte stark reduziert werden. Mit $w_{1/2} = 0,15-0,3$ min sind die erhaltenen Peaks aber immer noch etwa doppelt so breit wie bei Verwendung der Apparatur für isokratische CEC. In einem weiteren Experiment wurde U während der Probenaufgabe ganz abgeschaltet. Die übrigen Parameter wurden nicht geändert. Die erhaltenen Peaks sind nicht signifikant schmaler, als im vorhergehenden Experiment. Dies zeigt, daß die Probe nicht nur durch die angelegte Spannung, sondern auch durch den durch die Pumpe erzeugten Druck injiziert wird.

In einem folgenden Experiment wurde die Flußrate während der Probenaufgabe auf $F = 0,1$ mL/min gesenkt. Die Pumpe erzeugt dann einen Druck von 20 bar. Die Hochspannung blieb abgeschaltet. Da der Probenpfropf bei der kleineren Flußrate länger benötigt, um vom Injektor zum T-Stück zu gelangen, wurden die Probenaufgabebedingungen (F , U) für 2 min beibehalten. Dann wurde F auf 0,2 mL/min und U auf 25 kV gestellt. Das Verfahren wurde wieder mit der Trennung von Benzoesäureestern getestet. Abb. 28 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Die Peaks sind hochsymmetrisch und GAUSS-förmig. $w_{1/2}$ beträgt 0,1-0,17 min. Eine weitere Verringerung von F während der Probenaufgabe unter ansonsten gleichen Bedingungen führte zu einer Zunahme von $w_{1/2}$.

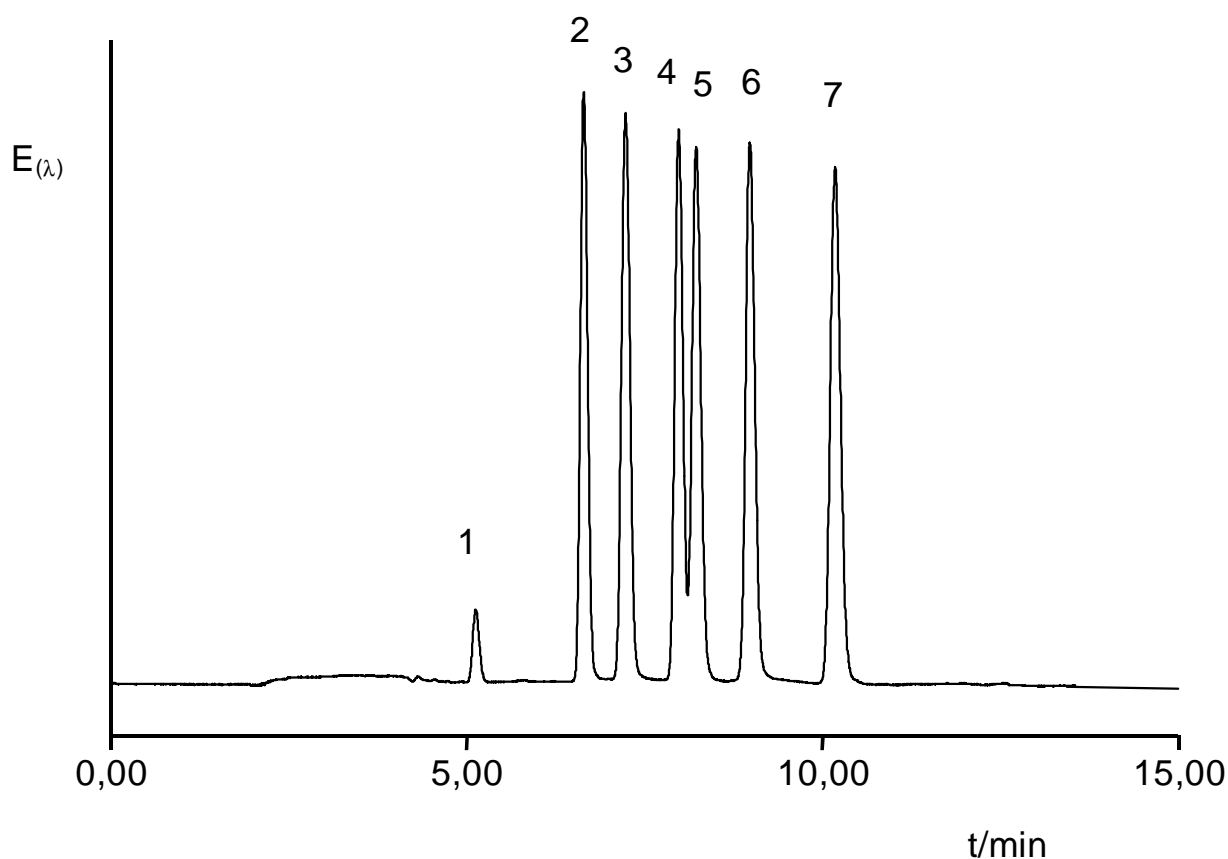


Abb. 28: Isokratische Trennung von Benzoesäureestern mit der Gradientenapparatur. Kapillarsäule, $L = 360(310)\text{mm} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ I.D., stat. Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3\text{ }\mu\text{m}$, mob. Phase AcCN/Phosphatpuffer ($c = 5\text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$), 8:2 v/v, Probenaufgabe bei $F = 0,1\text{ mL/min}$, $p = 20\text{ bar}$ und $U = 0\text{ kV}$ für 2 min, Trennung bei $F = 0,2\text{ mL/min}$, $p = 40\text{ bar}$, $U = 25\text{ kV}$, photometr. In-column-Det., $\lambda = 230\text{ nm}$, Analyte, 1 = Thioharnstoff, 2 = Benzoesäuremethylester, 3 = Benzoesäureethylester, 4 = Benzoesäurepropylester, 5 = Benzoesäurebenzylester, 6 = Benzoesäurebutylester, 7 = Benzoesäure-*i*-pentylester

Als Ursache dafür kommt eine Verbreiterung des Probenpfropfs durch Diffusionsvorgänge in der Kapillare zwischen Injektor und T-Stück in Betracht, die bei kleinen Flußraten verstärkt an Bedeutung gewinnen. Die beschriebenen Versuche wurden unter Verwendung einer $2\text{ }\mu\text{L}$ Probenschleife durchgeführt. Der Wechsel auf eine $1\text{ }\mu\text{L}$ Probenschleife brachte keine Verbesserung.

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß mit der vorgestellten Apparatur eine elektrokinetische Probenaufgabe möglich ist. Allerdings führt auch der durch die Pumpe applizierte Druck zu einer Probeninjektion. Der Fluß der mobilen Phase durch die Kapillarsäule muß also einen nicht zu vernachlässigbaren druckgetriebenen Anteil haben. Eine Verfeinerung der Anlage ist daher notwendig, um die Probenaufgabe ausschließlich elektrokinetisch durchführen zu können. So muß das Totvolumen zwischen Injektor und aufgabeseitigem T-Stück verkleinert und der Anteil des druckgetriebenen Flusses durch die Kapillarsäule verringert werden.

Bei nachfolgenden Versuchen wurde die Probenaufgabe stets wie folgt durchgeführt. Die Hochspannung wurde abgeschaltet und F auf 0,1 mL/min eingestellt und die Probe mittels des Injektors in das System eingebracht. Die eigentliche Injektion der Probe in die Kapillarsäule erfolgte, wie beschrieben, druckgetrieben. Nach 2 min wurde U auf die gewünschte Trennspannung und F auf 0,2 mL/min eingestellt. Mit dem Einschalten der Hochspannung wurden über eine Triggerschaltung Gradientenprogramm und Meßwertaufnahme gestartet.

7.3.2 Bestimmung des druckgetriebenen Anteils des Flusses der mobilen Phase

Wie in 7.3.1 gezeigt, ist bei der vorgestellten Apparatur der druckgetriebene Anteil am Fluß der mobilen Phase nicht vernachlässigbar klein. Zum Erhalt der Effizienz der CEC sollte dieser Anteil möglichst klein gehalten werden, um eine Überlagerung des kolbenförmigen Plug-flow mit dem parabolischen Profil des druckgetriebenen Flusses möglichst zu vermeiden. Der Anteil des druckgetriebenen Flusses am Gesamtfluß durch die Kapillarsäule wurde wie folgt bestimmt. Für verschiedene Trennspannungen ($U = 2 - 20$ kV) wurde t_0 bestimmt und daraus die Gesamt-Fließgeschwindigkeit v_G berechnet. Als t_0 -Marker wurde Thioharnstoff verwendet. Die Probenaufgabe wurde wie in 7.3.1 beschrieben durchgeführt.

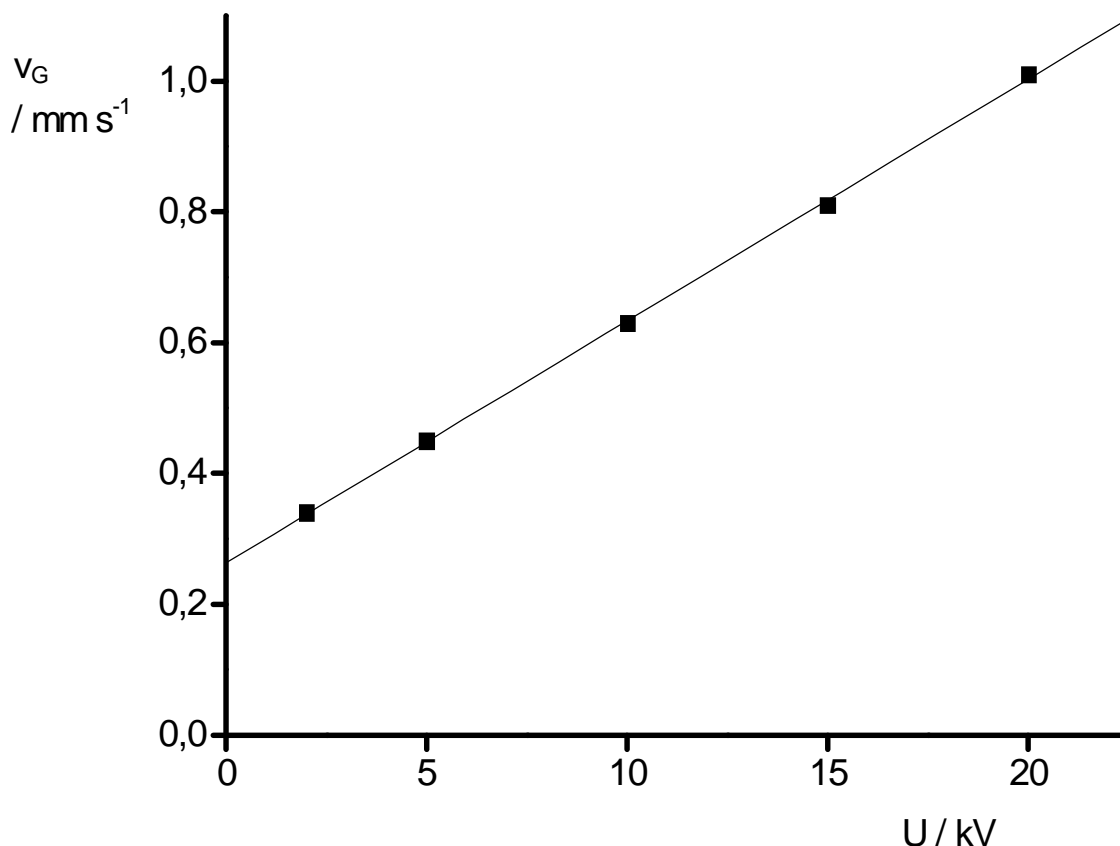


Abb. 29: Auftragung von v_G gegen U . Kapillarsäule, $L = 360(310)$ mm \times 100 μ m I.D., stat. Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3$ μ m, mob. Phase AcCN/Phosphatpuffer ($c = 2,5$ mmol/L, pH = 7,2) 8:2 v/v, $F = 0,2$ mL/min, $p = 40$ bar, photometr. In-column-Det., $\lambda = 254$ nm, t_0 -Marker Thioharnstoff

Es wird ein linearer Zusammenhang zwischen U und v_G erwartet. Der Achsabschnitt ($U = 0$ kV) entspricht dem druckgetriebenen Anteil v_{pd} an v_G . Bei der Berechnung von v_G wurde berücksichtigt, daß die Probenzone eine bestimmte Zeit benötigt, um vom Injektor zum Säulenkopf zu gelangen. Diese Zeitverzögerung wurde wie folgt berechnet. Die Kapillare zwischen Injektor und aufgabeseitigem T-Stück hat ein Volumen von 0,133 cm³ ($L = 30$ cm, I.D. = $7,5 \cdot 10^{-2}$ cm). Während der Probenaufgabe beträgt die Flußrate der mobilen Phase 0,1 mL/min oder 0,1 cm³/min. Folglich werden $0,133 \text{ cm}^3 / 0,1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1} = 1,33$ min benötigt, um die mobile Phase in der Kapillare vollständig zu ersetzen. Diese Zeit entspricht der Dauer, die der Probenpfropf benötigt, um vom Injektor zum Säulenkopf zu

gelangen. Zur Berechnung von v_G wurde dieser Wert auf 1,3 min gerundet und von t_0 abgezogen. Abb. 29 zeigt die Auftragung von v_G gegen U . Der Zusammenhang kann als linear angesehen werden ($r^2 = 0,9995$). Der Achsabschnitt beträgt 0,26 mm/s. Dies entspricht dem Wert von v_{pd} . Durch Messung von t_0 bei $U = 0$ kV wurde für v_{pd} der gleiche Wert erhalten.

v_G hat bei 20 kV einen Wert von 1,01 mm/s. Der Anteil von v_{eo} beträgt daran $v_G - v_{pd} = v_G - 0,26 \text{ mm/s} = 0,75 \text{ mm/s}$. Damit ist v_{pd} bei 20 kV um einen Faktor 2,9 kleiner als v_{eo} . Der Anteil des druckgetriebenen Flusses ist gegenüber dem EOF also auf keinen Fall zu vernachlässigen. Der Anteil von v_{pd} läßt sich jedoch durch Veränderung des Split-Verhältnisses und durch Erhöhung des Rückdrucks am detektorseitigen Ende der Kapillarsäule verringern.

7.3.3 Bestimmung der erreichbaren Effizienz

In Tab. 12 sind die Trennstufenzahlen N aufgeführt, die bei der Trennung mehrerer Benzoessäureester mit der Gradienten-Apparatur bei isokratischer Elution erreicht wurden. Die Probenaufgabe wurde wie in Abschnitt 7.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Tabelle enthält auch die Werte für N , die bei Trennung derselben Analyte mit der in dieser Arbeit ebenfalls vorgestellten Apparatur für isokratische CEC erreicht wurden. Die Probenaufgabebedingungen waren bei dieser Trennung so gewählt, daß von keinem Beitrag der Probenaufgabe zur Bandenverbreiterung ausgegangen werden kann. Es wurden verschiedene Kapillarsäulen verwendet. Die in beiden Versuchen erreichten Trennstufenzahlen sind aber repräsentativ für die mit dem jeweiligen chromatographischen System aus Kapillarsäule und Apparatur erreichbaren Trennstufenzahlen. Der unterschiedliche I.D. der Kapillarsäulen hat keinen signifikanten Einfluß auf N [56]. Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug in beiden Experimenten 0,93 mm/s. In beiden Experimenten wurden dieselbe stationäre Phase verwendet.

Tab. 12: Vergleich der erreichbaren Effizienz bei Verwendung (a) der Apparatur für isokratische CEC und (b) bei Verwendung der Gradientenapparatur im isokratischen Modus

Apparatur	(a)	(b)
Analyt	N/m	N/m
Benzoessäuremethylester	116000	58000
Benzoessäureethylester	104000	52000
Benzoessäurepropylester	104000	71000
Benzoessäurebenzylester	116000	65000
Benzoessäurebutylester	101000	77000
Benzoessäure- <i>i</i> -pentylester	89000	77000

Meßbedingungen: (a): Kapillarsäule, $L = 442(390)\text{mm} \times 180 \mu\text{m}$ I.D., Trennspannung $U = 20 \text{ kV}$, Probenaufgabe elektrokinetisch, 5 kV für 5 s ($L_i = 1,1 \text{ mm}$), Mob. Phase AcCN/Phosphatpuffer ($c = 1 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$), $8:2 \text{ v/v}$, (b): Kapillarsäule, $360(310) \text{ mm} \times 100 \mu\text{m}$ I.D., Trennspannung $U = 25 \text{ kV}$, Probenaufgabe wie in 7.3.1 beschrieben, Mob. Phase AcCN/Phosphatpuffer ($c = 5 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$), $8:2 \text{ v/v}$, beide: stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \mu\text{m}$, photometr. In-column-Detektion, $\lambda = 230 \text{ nm}$.

Die Zusammensetzung der mobilen Phase war bis auf die Phosphatkonzentration in beiden Versuchen gleich. Die verschiedene Phosphatkonzentration hat keinen signifikanten Einfluß auf N (siehe 6.2.2, S. 59).

Im Mittel sind die erzielten N bei Verwendung der Gradientenapparatur um einen Faktor 1,6 kleiner als bei Verwendung der Apparatur für isokratische CEC. Diese signifikante Verringerung von N kann auf den nicht zu vernachlässigenden Beitrag des druckgetriebenen Flusses zum Gesamtfluß der mobilen Phase bei der Gradientenapparatur zurückgeführt

werden. Dadurch werden die Effizienz-steigernden Eigenschaften des Plug-flow teilweise wieder kompensiert. Zum anderen ist es denkbar, daß die Probenaufgabe bei der Gradientenapparatur einen signifikanten Beitrag zur Bandenverbreiterung leistet. Der Fluß der mobilen Phase in der Kapillare zwischen Injektor und aufgabeseitigem T-Stück ist druckgetrieben. Daraus resultiert eine laminare Strömung, durch die der Probenpfropf verbreitert wird. Durch die Verbreiterung des Probenpfropfs sinkt die Trennstufenzahl. Diese Vermutung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durch ein Experiment verifiziert werden. Die Hypothese wird aber dadurch gestützt, daß bei der Gradientenapparatur für Analyte mit kleinem k die niedrigsten Trennstufenhöhen erhalten wurden. Dies weist auf eine Bandenverbreiterung außerhalb der Kapillarsäule hin.

7.3.4 Überprüfung der Genauigkeit des gelieferten Gradienten

Wichtig für die Genauigkeit quantitativer Analysen ist die Wiederholpräzision für die Retentionszeit t_r und die Peakfläche A . Beim Einsatz von Fließmittelgradienten hängen diese Größen u. a. von der Genauigkeit des gelieferten Gradienten ab. Die Genauigkeit des Gradienten ist bestimmt durch die Übereinstimmung zwischen programmierter und gelieferter Fließmittelzusammensetzung, der Geschwindigkeit, mit der eine programmierte Änderung der Fließmittelzusammensetzung durch das System umgesetzt wird (Gradientenverzögerung), sowie der Wiederholbarkeit des Gradienten für mehrere Analysen.

Zur Überprüfung der Genauigkeit des gelieferten Gradienten wurde die Apparatur so umgebaut, daß die Detektion in der Quarzglaskapillare zwischen den beiden T-Stücken erfolgen konnte. Das Detektionsfenster befand sich 5 cm oberhalb des Splitpunkts des Stroms der mobilen Phase. Ansonsten wurde der Aufbau der Apparatur nicht verändert. Der Umbau war notwendig, um die Gradientenverzögerung bestimmen zu können. Die Gradientenverzögerung ist die Zeit, die zwischen dem programmierten Zeitpunkt der Lieferung einer bestimmten Fließmittelzusammensetzung

zung und ihrer Bereitstellung am Säulenkopf verstreicht. Durch die Lage des Detektionsfensters 5 cm oberhalb des Splitpunkts und damit des Säulenkopfs kommt es zu einer geringen Zeitverzögerung zwischen der Bereitstellung einer bestimmten Fließmittelzusammensetzung am Säulenkopf und ihrer Bereitstellung im Bereich des Detektionsfensters. Die Zeitverzögerung läßt sich wie folgt abschätzen. Die Quarzglaskapillare hat einen I.D. von 75 µm. Das Volumen der Quarzglaskapillare vom Splitpunkt bis zum Detektionsfenster beträgt demnach $2,2 \cdot 10^{-4}$ mL. Bei der gewählten Flußrate von 0,2 mL/min wird dieses Volumen in $1,1 \cdot 10^{-3}$ min vollständig ersetzt. Diese Zeit entspricht der genannten Zeitverzögerung. Bei dieser Berechnung wurde vereinfachend angenommen, daß der Fluß durch die gepackte Kapillarsäule gegenüber dem Fluß durch die Quarzglaskapillare vernachlässigbar ist. Die Flußrate in gepackten Kapillarsäulen, wie den in dieser Arbeit verwendeten, beträgt ca. 1 µL/min [40]. Die Vereinfachung ist also zulässig.

In einem Experiment wurde ein Gradientenprogramm dreimal hintereinander ausgeführt. Das Gradientenprogramm ist in Tab. 13 wiedergegeben. Die zur Gradientenformung verwendeten mobilen Phasen A und B sind identisch: AcCN/Phosphatpuffer 8:2 v/v. B ist mit Thioharnstoff als inertem Tracer versetzt.

Tab. 13: Gradientenprogramm zur Überprüfung der Genauigkeit des durch die Gradientenapparatur gelieferten Fließmittelgradienten

t/min	B/%
0 - 5	0
5 - 10	0 - 50
10 - 20	50
20 - 25	50 - 0

B = Fließmittel B

Die gemessene Extinktion ist ein Maß für den Volumenanteil von B in der aktuellen Zusammensetzung der mobilen Phase. Die Detektion erfolgte bei $\lambda = 254 \text{ nm}$. In Abb. 30 werden der programmierte Gradient und die gelieferten Gradienten miteinander verglichen.

Der programmierte zeitliche Verlauf des Gradienten wird durch den des gelieferten Gradienten sehr gut wiedergegeben. Bei mehrmaliger Ausführung des Gradientenprogramms wird eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der aufeinanderfolgend gelieferten Gradienten erreicht. Dabei stimmen die gelieferten Gradienten nicht nur in der Form miteinander überein; es wird auch stets zu demselben Zeitpunkt dieselbe Fließmittelzusammensetzung geliefert. Der Anteil von B in der mobilen Phase soll nach dem Gradientenprogramm nach 5 min zu steigen beginnen. Dieser Anstieg wird 9 min nach dem Start des Programms detektiert. Die Gradientenverzögerung beträgt somit 4 min. Bei der Bestimmung dieses Werts wurde die Zeitverzögerung aufgrund der Lage des Detektionsfensters (s. o.) vernachlässigt. Das Volumen der Mischkammer der Pumpe beträgt 0,5 mL. Bei der gewählten Flußrate von 0,2 mL/min beträgt die Zeit, in der die mobile Phase in der Mischkammer vollständig ersetzt wird, 2,5 min. In 7.3.2 wurde die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um vom Injektor zum aufgabeseitigen T-Stück zu gelangen, zu 1,3 min bestimmt. Aufgrund der Totvolumina durch die Mischkammer und die Kapillare zwischen Injektor und T-Stück ergibt sich rechnerisch somit eine Gradientenverzögerung von $2,5 \text{ min} + 1,3 \text{ min} = 3,8 \text{ min}$. Dieser Wert entspricht dem experimentell bestimmten und läßt darauf schließen, daß die Gradientenverzögerung maßgeblich durch die Totvolumina der Mischkammer und der Kapillare zwischen Injektor und T-Stück bestimmt wird. Die Gradientenverzögerung ist bei dem vorgestellten System noch akzeptabel, und kleiner als bei vergleichbaren Apparaturen [21, 59].

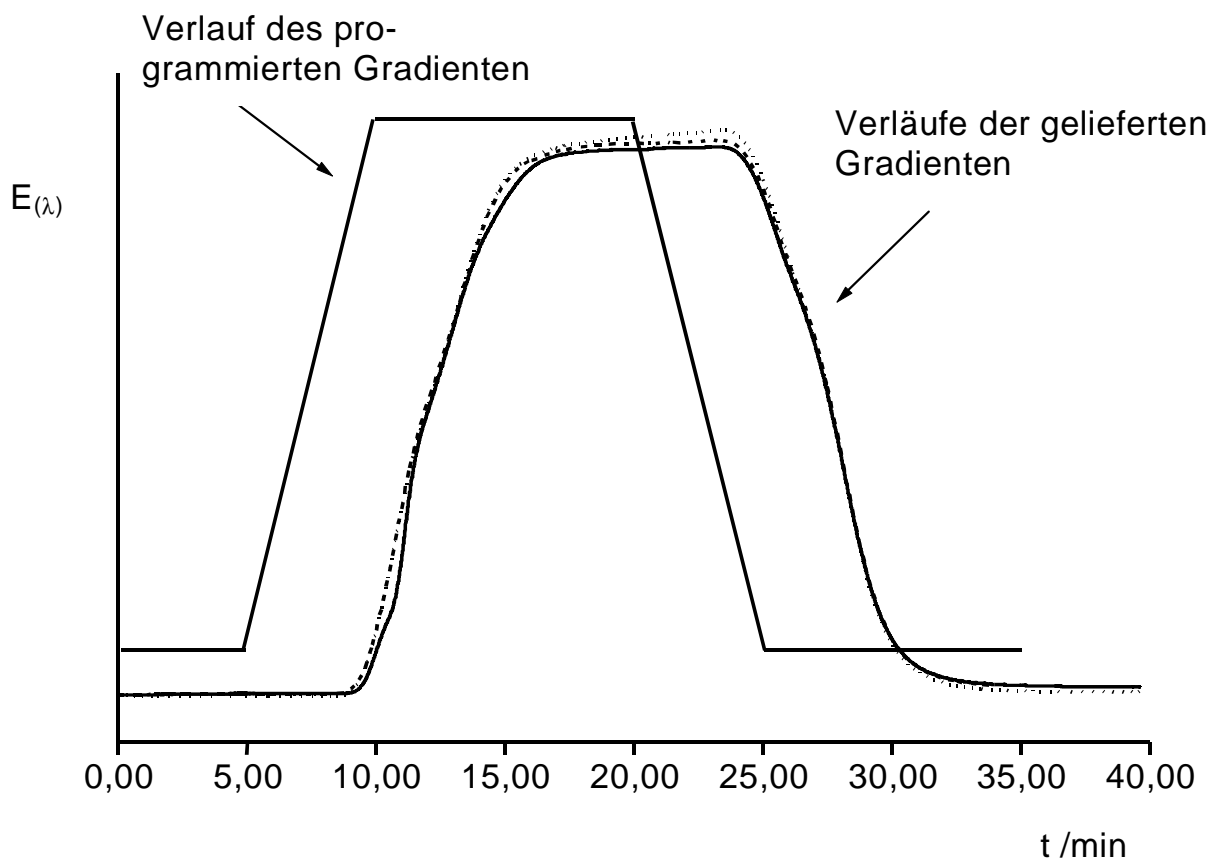


Abb. 30: Vergleich eines programmierten Fließmittelgradienten mit dem durch die Gradientenapparatur gelieferten Fließmittelgradienten. 3 aufeinanderfolgende Wiederholungen, Kapillarsäule, $L = 360(310) \text{ mm} \times 100 \text{ } \mu\text{m}$ I.D., stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \text{ } \mu\text{m}$, mobile Phasen, A: AcCN/Phosphatpuffer ($c = 5 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$), 8:2 v/v, B: wie A, mit Zusatz von Thioharnstoff als inertem Tracer, $F = 0,2 \text{ mL/min}$, Trennungsspannung 25 kV, Detektion siehe Text

7.3.5 Wiederholpräzision

Wie in 7.3.4 gezeigt, ist die Übereinstimmung der gelieferten Gradienten mit dem programmierten Gradienten bei der vorgestellten Apparatur zufriedenstellend. Die Wiederholbarkeit der Peakflächen A und Retentionszeiten t_r sollte daher auch zufriedenstellend sein. Um dies zu verifizieren, wurden mehrere Benzoessäureester unter Anwendung eines Fließmittelgradienten getrennt. Es wurden 10 aufeinanderfolgende Trennungen durchgeführt. Die Probenaufgabe wurde wie in 7.3.1 beschrieben ausgeführt. Abb. 31 zeigt die übereinandergelegten Chromatogramme von 3 Analysen. Dargestellt sind der 1., der 5., und der 10. Lauf.

In Tab. 14 sind die berechneten Werte der relativen Standardabweichungen RSD für t_r und A aufgeführt. Die Tabelle enthält auch die Werte für RSD der auf die Peakfläche von Benzoessäure-*i*-pentylester normalisierten Peakflächen A_n . Die Werte für $RSD(t_r)$ können mit ca. 2 % als ausreichend betrachtet werden. YAN et al. [29] erreichten mit der von ihnen entwickelten Gradientenapparatur für $RSD(t_r)$ nur Werte von 3 - 8% ($n = 5$). Sie führten diese vergleichsweise hohe Ungenauigkeit auf mangelnde Automatisierung der Apparatur und fehlende Thermostatisierung der Kapillarsäule zurück. Letzteres trifft auch auf die hier vorgestellte Apparatur zu. Bei dieser wurde aber, im Gegensatz zu der Apparatur, die in [29] vorgestellt wird, ein Injektor zur Probenaufgabe benutzt. Trotz des manuellen Betriebs des Injektors lässt sich damit die Probenaufgabe mit höherer Reproduzierbarkeit gestalten, als ohne Injektor. Bei weitergehender Automation lässt sich die Reproduzierbarkeit von t_r weiter steigern. So erreichten TAYLOR und TEALE [21] bei Verwendung eines Autosamplers in der Gradienten-CEC Werte für $RSD(t_r)$ von 0,5 - 1% ($n = 20$).

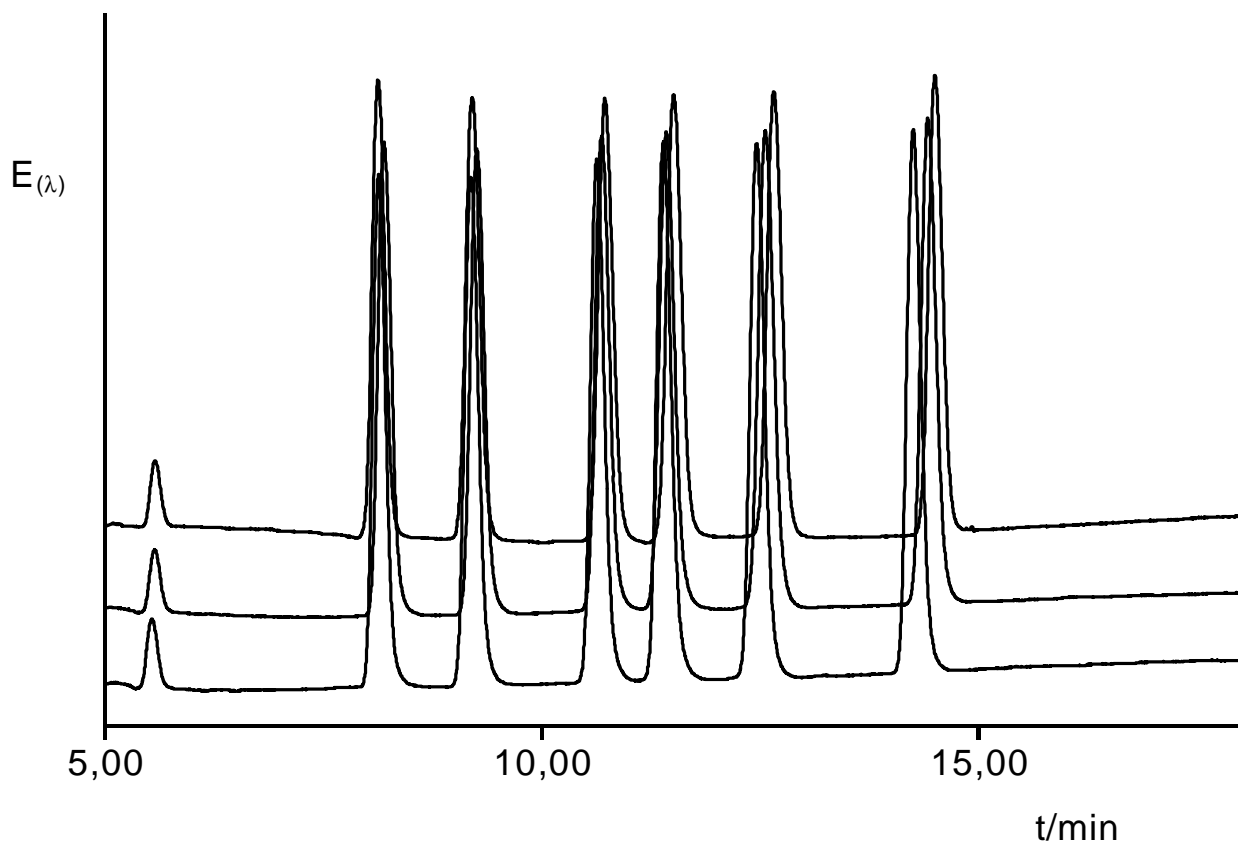


Abb. 31: Vergleich von 3 Trennungen von Benzoesäureestern bei Anwendung eines Fließmittelgradienten (1., 5. u. 10. Lauf). Kapillarsäule, $L = 360(310) \text{ mm} \times 100 \text{ } \mu\text{m}$ I.D., stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \text{ } \mu\text{m}$, mobile Phasen, A: AcCN/Phosphatpuffer ($c = 5 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$) 8:2 v/v, B: Phosphatpuffer ($c = 5 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$), Gradientenprogramm: 7 % B für 5 min, 7 - 0 % B in 5 min, 0 % B für 10 min, Trennspannung 25 kV, photometr. In-column-Det., $\lambda = 230 \text{ nm}$, Analyte (in Elutionsfolge): Thioharnstoff, Benzoesäuremethylester, Benzoesäureethylester, Benzoesäurepropylester, Benzoesäurebenzylester, Benzoesäurebutylester, Benzoesäure-*i*-pentylester

Tab. 14: Relative Standardabweichungen RSD der Benzoessäureester für t_r , A und A_n

Analyt	RSD(t_r) /%	RSD(A) /%	RSD(A_n) /%
Benzoessäuremethylester	2,19	3,56	3,20
Benzoessäureethylester	2,34	4,00	2,49
Benzoessäurepropylester	2,22	4,11	2,75
Benzoessäurebenzylester	2,18	4,32	1,69
Benzoessäurebutylester	1,94	4,42	1,29
Benzoessäure- <i>i</i> -pentylester	1,75	4.95	-

$n = 10$, $A_n = A$, normalisiert auf A von Benzoessäure-*i*-pentylester, Meßbedingungen siehe Abb. 31

Die Werte für RSD(A) liegen mit 4 - 5% vergleichsweise hoch. Sie sind deutlich höher als die Werte, die mit vergleichbaren Apparaturen erreicht werden [21]. Werden die Peakflächen auf einen internen Standard normalisiert, wird die Wiederholbarkeit der Peakflächen deutlich verbessert. Die Werte für RSD(A_n) betragen 1 - 3 %. Dieses Ergebnis legt den Schluß nahe, daß die mangelnde Wiederholbarkeit für A auf eine unzureichend wiederholbare Probenaufgabe zurückzuführen ist. Für die unzureichend wiederholbare Probenaufgabe können eine Verbreiterung der Probenzone in der Kapillare zwischen Injektor und aufgabeseitigem T-Stück und eine dadurch bedingte, nicht reproduzierbare Verdünnung der Probe verantwortlich sein. Insgesamt ist jedoch die mit der vorgestellten Apparatur erreichbare Wiederholbarkeit zufriedenstellend. Durch weitergehende Automation, Thermostatisierung der Kapillarsäule, und Verringerung von Totvolumina dürfte sie weiter zu verbessern sein.

7.4 Trennungen unter Anwendung von Fließmittelgradienten

7.4.1 Trennung von Benzoessäureestern

Vor einer weitergehenden Optimierung der Gradientenapparatur sollte der Einfluß von Fließmittelgradienten auf elektrochromatographische Trennungen untersucht werden. Bei allen im folgenden beschriebenen Trennungen wurden die Probenaufgabe und der Start der Analyse wie in 7.3.1 beschrieben durchgeführt.

In Abb. 32 werden isokratische Trennungen mehrerer Benzoessäureester bei verschiedenem Wassergehalt $\varphi(\text{H}_2\text{O})$ der mobilen Phase mit einer Trennung derselben Analyte unter Verwendung eines Fließmittelgradienten verglichen. Als Fließmittel wurden AcCN/Phosphatpuffer ($c = 5 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$) 8:2 v/v (Fließmittel A) und Phosphatpuffer ($c = 5 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$) (Fließmittel B) verwendet. Es wurden isokratische Trennungen unter Verwendung von Fließmittel A ($\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 20 \%$) und unter Verwendung eines Fließmittels aus 90 % A und 10 % B ($\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 28\%$) durchgeführt. Letzteres wurde nicht vorgemischt, sondern durch Mischen entsprechender Mengen A und B durch die Gradientenpumpe während der Analyse bereitgestellt. Bei der Trennung unter Verwendung eines Gradienten wurde folgendes Gradientenprogramm benutzt: 7 % B für 5 min, 7 - 0% B in 5 min, 0 % B für 10 min.

Bei isokratischer Trennung der Benzoessäureester mit $\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 20\%$ ist die Analysendauer kurz, es werden aber nicht alle Komponenten bis zur Basislinie getrennt. Bei isokratischer Trennung mit $\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 28 \%$ wird infolge des größeren Wassergehalts der mobilen Phase die Analysendauer verdoppelt und die Retentionszeiten der unpolaren Analyte werden verlängert. Es werden zwar alle Komponenten bis zur Basislinie getrennt, aber es muß eine Verlängerung Analysendauer in Kauf genommen werden. Bei der Anwendung des Fließmittelgradienten werden die Analyte infolge des größeren Wassergehalts der mobilen Phase zu Beginn der Analyse stark retardiert.

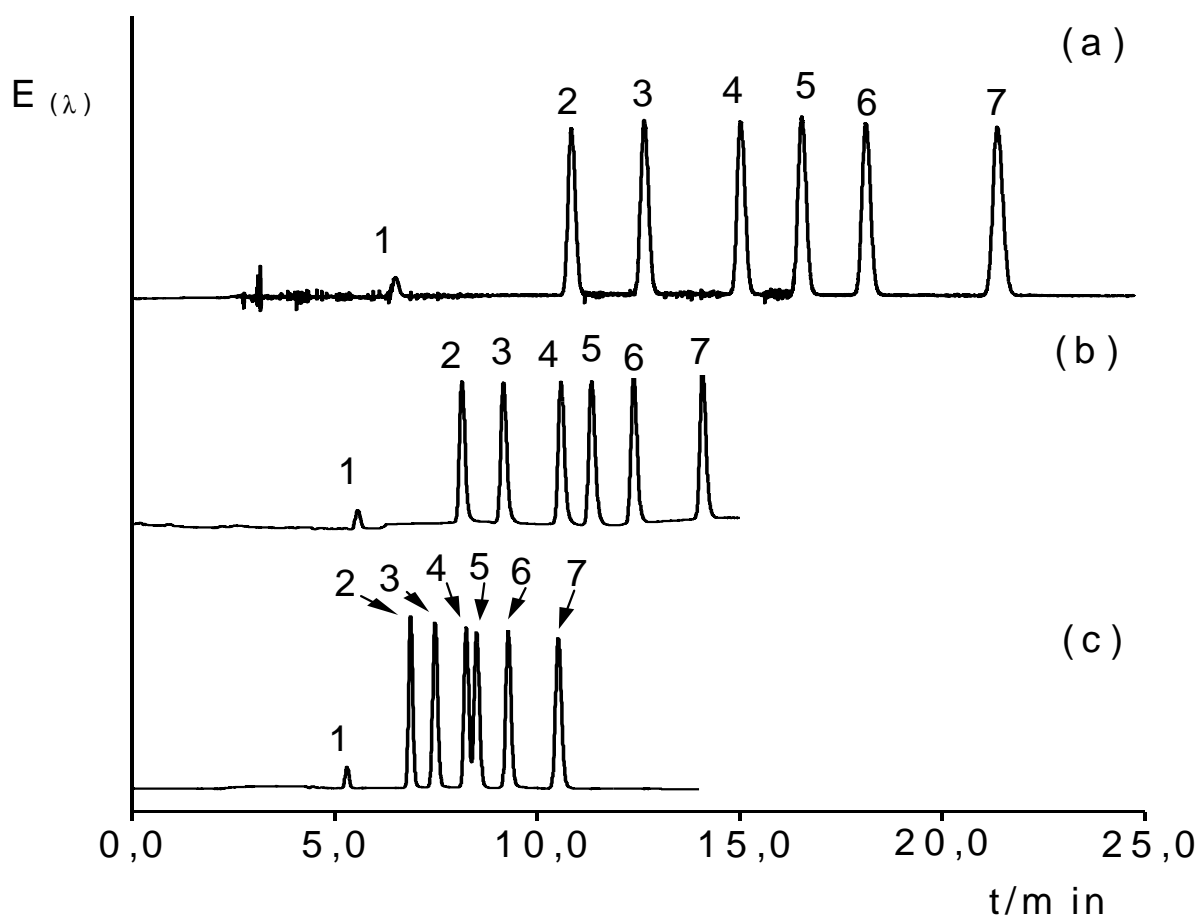


Abb. 32: Trennung von Benzoesäureestern unter isokratischen Bedingungen (a, c) und unter Anwendung eines Fließmittelgradienten (b). Kapillarsäule, $L = 360(310)\text{mm} \times 100\text{ }\mu\text{m I.D.}$, stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3\text{ }\mu\text{m}$, mobile Phasen, A: AcCN/Phosphatpuffer ($c = 5\text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$) 8:2 v/v, B: Phosphatpuffer ($c = 5\text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$), Fließmittelzusammensetzung, (a): 90 % A, 10 % B ($\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 28\%$), (b): 7 % B für 5 min, 7 - 0 % B in 5 min, 0 % B für 10 min, (c): 100 % A, 0 % B ($\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 20\%$), Trennungsspannung 25 kV, Flußrate 0,2 mL/min, photometrische In-column-Det., $\lambda = 230\text{ nm}$, Analyte, 1 = Thioharnstoff, 2 = Benzoesäuremethylester, 3 = Benzoesäureethylester, 4 = Benzoesäurepropylester, 5 = Benzoesäurebenzylester, 6 = Benzoesäurebutylester, 7 = Benzoesäure-*i*-pentylester

Durch die anschließende Verringerung des Wassergehalts nimmt die Retention der später eluierten Analyte im weiteren Verlauf der Analyse ab. Dadurch wird eine ausreichende Trennung aller Komponenten erreicht, und die Analysendauer gegenüber der isokratischen Trennung mit $\phi(\text{H}_2\text{O}) = 20\%$ nur um einen Faktor 1,5 erhöht. Die Veränderung der Fließmittelzusammensetzung durch das verwendete Gradientenprogramm hat auf die Retention der unpolaren Benzoessäureester denselben Einfluß, wie man ihn in der RP-HPLC erwartet [55]. Durch den geringfügig höheren Wassergehalt der mobilen Phase zu Beginn der Analyse wird t_0 bei der Gradientenelution im Vergleich mit der isokratischen Elution mit $\phi(\text{H}_2\text{O}) = 20\%$ nur geringfügig erhöht.

In Tab. 15 ist die Auflösung R für aufeinanderfolgend eluierte Peakpaare für die in Abb. 32 dargestellten Chromatogramme wiedergegeben. Bei $\phi(\text{H}_2\text{O}) = 20\%$ ist R für das Peakpaar Benzoessäurepropylester/Benzoessäurebenzylester nicht ausreichend, um die Peakflächen quantitativ auswerten zu können. R muß dazu mindestens 1,25 betragen [60]. Für das genannte Peakpaar beträgt R jedoch 1,02. Bei $\phi(\text{H}_2\text{O}) = 28\%$ ist R für alle Peakpaare ausreichend, um die Peakflächen quantitativ auswerten zu können. Allerdings ist R oft größer als notwendig, d. h. durch die hohe Auflösung wird die Analysenzeit verlängert, ohne einen weiteren Gewinn an Information aus dem Chromatogramm zu erhalten. Bei der Verwendung des Fließmittelgradienten ist R für alle Peakpaare größer als 1,25. Durch die Verwendung des Gradienten läßt sich bei kürzerer Analysenzeit die gleiche Information aus dem Chromatogramm gewinnen, wie es unter isokratischen Bedingungen nur bei längerer Analysendauer möglich ist.

Tab. 15: Auflösung R für verschiedene Benzoessäureester bei isokratischer Trennung und bei Anwendung eines Fließmittelgradienten

Peakpaar	Isokratisch $\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 20 \%$	Isokratisch $\varphi(\text{H}_2\text{O}) = 28 \%$	Gradient
2,3	2,74	5,18	3,88
3,4	3,41	6,53	5,11
4,5	1,02	3,99	2,64
5,6	3,26	3,94	3,57
6,7	4,24	4,24	6,08

2 = Benzoessäuremethylester, 3 = Benzoessäureethylester, 4 = Benzoessäurepropylester, 5 = Benzoessäurebenzylester, 6 = Benzoessäurebutylester, 7 = Benzoessäure-*i*-pentylester, experimentelle Bedingungen siehe Abb. 32

Bei Gradientenelution wird in der RP-LC eine Fokussierung der später eluierten Peaks bei Erhöhung des Gehalts des organischen Modifiers der mobilen Phase im Verlauf der Analyse erzielt (Peak-sharpening). Erreicht ein Fließmittel mit höherem Gehalt an organischem Modifier als das bisherige eine Analytzone, kommt es zu einer lokalen Verringerung von k des Analyten. Dadurch bewegt sich der in Fließrichtung betrachtet hintere Teil der Analytzone schneller als der vordere, wodurch die Probenzone fokussiert wird. Der Effekt ist umso ausgeprägter, je höher der Modifiziergehalt in der neuen mobilen Phase gegenüber dem in der alten ist. Abb. 33 verdeutlicht dies an der Trennung mehrerer Benzoessäureester bei Gradientenelution. In dem dargestellten Chromatogramm ist $w_{1/2}$ des Peaks der zuletzt eluierten Substanz ($w_{1/2} = 0,12 \text{ min}$) um 25% kleiner als $w_{1/2}$ des Peaks der zuerst eluierten Substanz ($w_{1/2} = 0,16 \text{ min}$). Durch das Peak-sharpening wird die Peakkapazität des chromatographischen Systems erheblich erhöht.

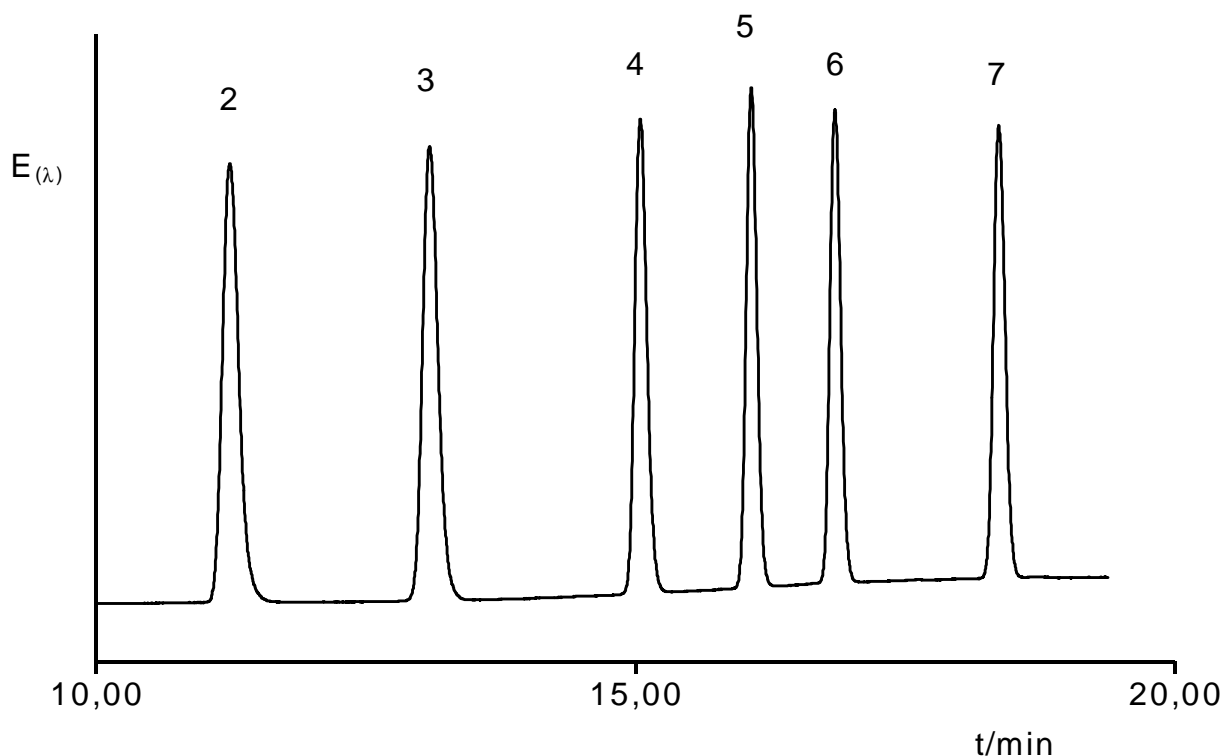


Abb. 33: Fokussierung der Peaks von Benzoessäureestern bei Gradientenelution. Kapillarsäule, $L = 360(310)\text{mm} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ I.D., stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3\text{ }\mu\text{m}$, mobile Phasen, A: AcCN/Phosphatpuffer ($c = 5\text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$) 8:2 v/v, B: Phosphatpuffer ($c = 5\text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$), Gradient: 15 % B für 5 min, 15 - 0 % B in 5 min, 0 % B für 10 min, Trennungsspannung 25 kV, Flußrate 0,2 mL/min, photometrische In-column-Det., $\lambda = 230\text{ nm}$, Analyte, 1 = Thioharnstoff, 2 = Benzoessäuremethylester, 3 = Benzoessäureethylester, 4 = Benzoessäurepropylester, 5 = Benzoessäurebenzylester, 6 = Benzoessäurebutylester, 7 = Benzoessäure-*i*-pentylester

7.4.2 Trennung von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen mit binären Fließmittelgradienten

Die Trennung von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen (PAH) stellt, infolge der umwelt- und gesundheitsschädlichen Eigenschaften dieser Verbindungen, ein wichtiges analytisches Problem dar. Zur Trennung von 16 als besonders gefährlich eingestuften PAH (EPA-PAH) wurde von der Environmental Protection Agency (EPA) der USA ein Verfahren unter Verwendung der Gradienten-HPLC entwickelt (EPA Method 8310). Als stationäre Phasen werden dabei solche verwendet, die eine „Shape-selectivity“ besitzen. An diesen Phasen werden Moleküle vergleichbarer Hydrophobie aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge-zu-Breite-Verhältnisse unterschiedlich stark retardiert [61, 62]. Aufgrund der höheren Effizienz der CEC im Vergleich mit der HPLC, ist es denkbar, daß die Unterschiede der Hydrophobizität der PAH ausreichen, um sie mit dieser Methode an einer stationären Phase ohne Shape-selectivity zu trennen. Zur Verkürzung der Analysendauer ist es dabei sinnvoll, die Elutionskraft der mobilen Phase im Verlauf der Analyse durch Verringerung ihres Wassergehalts zu steigern. Der Einsatz der Gradienten-CEC scheint für dieses Trennproblem daher sehr geeignet zu sein. Deshalb wurde versucht, die EPA-PAH unter Verwendung eines Fließmittelgradienten mit einer gewöhnlichen ODS-Phase zu trennen.

In Abb. 34 wird die Trennung der 16 EPA-PAH bei isokratischer Elution gezeigt. Als stationäre Phase wurde Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \mu\text{m}$, verwendet. Die mobile Phase bestand aus AcCN/Phosphatpuffer ($c = 1,25 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$) 8:2 v/v. Da der verwendete Detektor nur die Detektion bei einer Wellenlänge gestattet, ist die Empfindlichkeit des Verfahrens für die einzelnen Analyte sehr unterschiedlich. Mit $t_r = 24,58 \text{ min}$ des zuletzt eluierten Peaks ist die Analysendauer noch vertretbar.

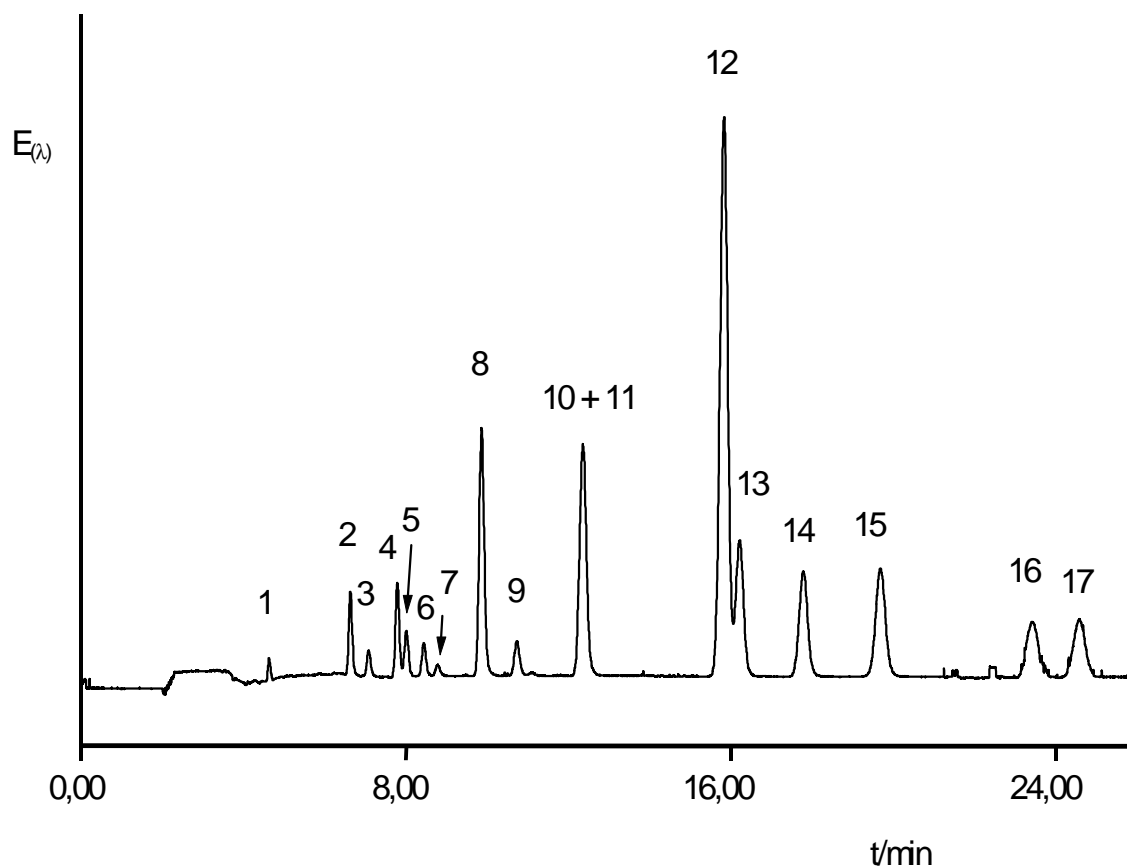


Abb. 34: Isokratische Trennung der 16 EPA-PAH. Kapillarsäule, $L = 330(286) \times 100 \mu\text{m}$ I.D., stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \mu\text{m}$, mobile Phase AcCN/Phosphatpuffer ($c = 1,25 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$) 8:2 v/v, Flußrate $0,2 \text{ mL/min}$, Trennspannung 30 kV , photometr. In-column-Det., $\lambda = 280 \text{ nm}$, Analyte, 1 = Thioharnstoff, 2 = Naphthalin, 3 = Acenaphthylen, 4 = Fluoren, 5 = Acenaphthen, 6 = Phenanthren, 7 = Anthracen, 8 = Fluoranthren, 9 = Pyren, 10 = Chrysen, 11 = Benzo(a)anthracen, 12 = Benzo(b)fluoranthren, 13 = Benzo(k)fluoranthren, 14 = Benzo(a)pyren, 15 = Dibenz(a,h)anthracen, 16 = Indeno(1,2,3-c,d)pyren, 17 = Benzo(g,h,i)perylene

Allerdings erlaubt die isokratische Elution nicht die Identifikation und Quantifizierung aller 16 EPA-PAH. Es sind, ohne den Peak von Thioharnstoff mitgezählt, nur 15 Peaks erkennbar. Chrysen und Benzo(a)anthracen werden koeluiert. In Tab. 16 sind die Werte für die Halbwertsbreite $w_{1/2}$ und die Auflösung R aufeinanderfolgend eluierter Peaks für die in Abb. 34 gezeigte isokratische Trennung aufgeführt. Die Tabelle enthält auch die entsprechenden Werte für die in Abb. 35 gezeigte Trennung der EPA-PAH bei Gradientenelution. Nach Tab. 16 ist für 4 Komponenten R kleiner als 1,25 und damit nicht ausreichend, um die Peakflächen quantitativ auswerten zu können. Neben dem Peakpaar Chrysen/Benzo(a)anthracen ist dies beim Peakpaar Benzo(b)fluoranthren/Benzo(k)fluoranthren der Fall.

Bei Einsatz eines binären Fließmittelgradienten konnten alle 16 EPA-PAH an der gleichen stationären Phase, wie sie bei der isokratischen Trennung benutzt wurde, getrennt werden. Es konnten jedoch nur 12 Komponenten soweit getrennt werden, daß eine quantitative Auswertung der Peakflächen möglich war. Durch den höheren Wassergehalt der mobilen Phase zu Beginn der Analyse ist t_0 bei der Gradientenelution um 1 min höher als bei der isokratischen Elution. Das Chromatogramm wird in Abb. 35 gezeigt. Aus Tab. 16 ist ersichtlich, daß sich R für die meisten Peakpaare bei Gradientenelution gegenüber der isokratischen Trennung erhöht hat, außer für das Peakpaar Fluoren/Acenaphthen. Gegenüber der isokratischen Trennung verdoppelt sich die Analysendauer bei der Trennung mittels Gradientenelution. Dennoch steigen die Werte für $w_{1/2}$ bei letzterer für die spät eluierten Analyte nicht über die Werte für $w_{1/2}$ der Peaks derselben Analyte bei isokratischer Elution. Als Ursache ist das Peaksharpening zu nennen, durch welches die Peakkapazität des chromatographischen Systems erhöht wird.

Tab. 16: Werte für Halbwertsbreite $w_{1/2}$ und Auflösung R für aufeinanderfolgend eluierte Peakpaare der EPA-PAH bei isokratischer Trennung (a) und Gradientenelution (b)

Analyt	(a) Isokratisch		(b) Gradient	
	$w_{1/2}$ /min	R	$w_{1/2}$ /min	R
Naphthalin	0,09	2,79	0,15	5,75
Acenaphthylen	0,10	3,93	0,17	8,33
Fluoren	0,11	1,23	0,19	0,62
Acenaphthen	0,11	2,31	0,19	4,88
Anthracen	0,11	1,74	0,19	3,14
Phenanthren	0,12	5,10	0,19	8,50
Fluoranthren	0,13	3,76	0,21	4,72
Pyren	0,14	5,83	0,21	10,80
Chrysen	0,19	0,00	0,25	0,74
Benzo(a)anthracen	0,19	10,27	0,26	14,32
Benzo(b)fluoranthren	0,21	1,04	0,26	1,76
Benzo(k)fluoranthren	0,22	4,12	0,25	4,29
Benzo(a)pyren	0,23	4,60	0,27	8,17
Dibenz(a,h)anthracen	0,26	7,10	0,27	8,02
Indeno(1,2,3-c,d)perylene	0,36	1,97	0,31	1,88
Benzo(g,h,i)perylene	0,33	-	0,31	-

(a) Experimentelle Bedingungen siehe Abb. 34

(b) Experimentelle Bedingungen siehe Abb. 35

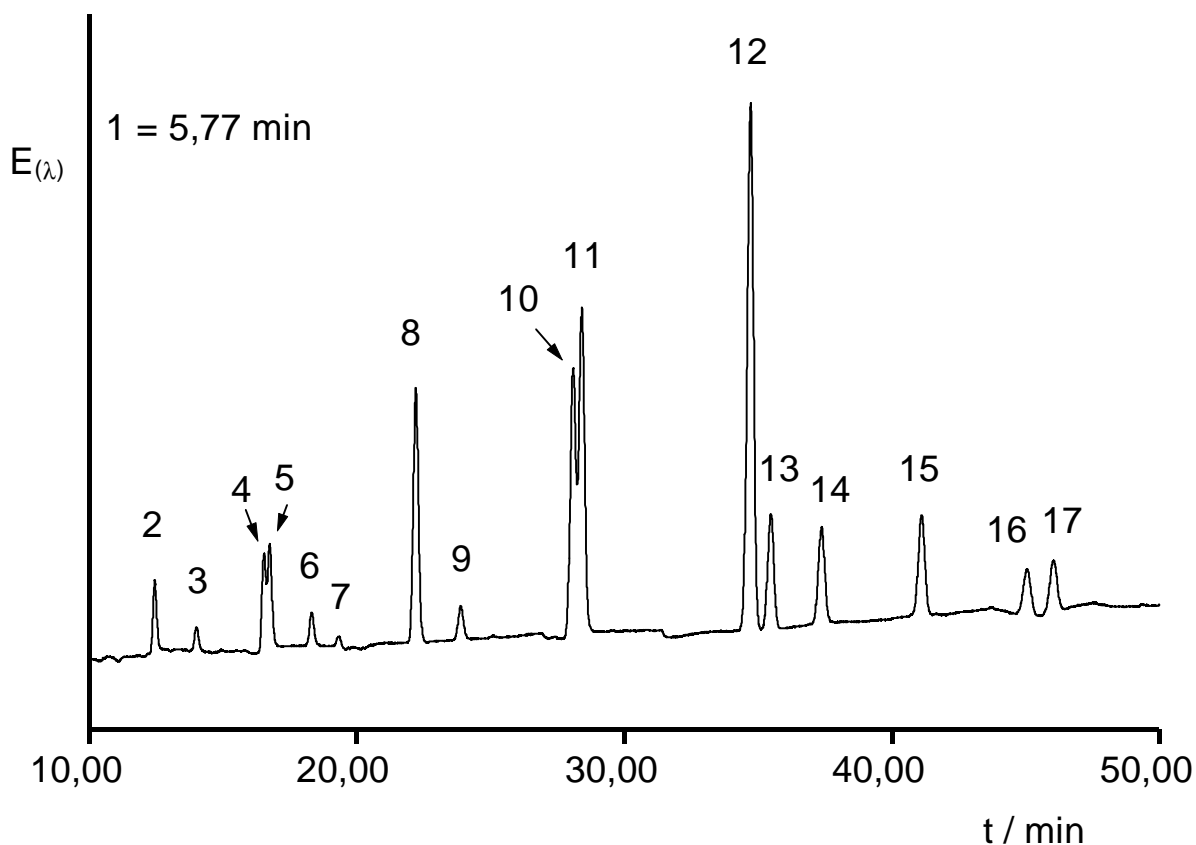


Abb. 35: Trennung der 16 EPA-PAH bei Verwendung eines binären Fließmittelgradienten. Mobile Phasen, A: AcCN/Phosphatpuffer (c = 1,25 mmol/L, pH = 7,2) 8:2 v/v, B: Phosphatpuffer (c = 1,25 mmol/L, pH = 7,2), Gradientenprogramm: 15-0 % B in 40 min, 0 % B für 15 min, sonstige Bedingungen siehe Abb. 34

Das in Abb. 35 gezeigte Chromatogramm stellt das beste Ergebnis dar, welches mit einem binären Fließmittelgradienten erzielt werden konnte. Auf diesem Weg konnte keine vollständige Trennung aller Komponenten der Testmischung erreicht werden. Eine weitere Erhöhung des Wassergehalts zu Beginn der Analyse führt zu einer Koelution von Fluoren und Acenaphthen. Außerdem wird dabei die Analysendauer erheblich verlängert.

Die Anwendung eines binären Gradienten erlaubt mit dem vorgestellten System (Gradientenapparatur, mobile/stationäre Phase) zumindest den Nachweis aller 16 EPA-PAH. Als Ursache für die nicht vollständige Trennung dieser PAH ist die fehlende Shape-selectivity der verwendeten stationären Phase anzusehen. Den starken Einfluß der stationären Phase auf die Trennung von PAH konnten YAN et al. [29] zeigen. Sie verwendeten als stationäre Phase eine Mischung aus ODS-Silicagel, $d_p = 3 \mu\text{m}$, mit nativem Silicagel, $d_p = 1 \mu\text{m}$, im Verhältnis 9:1. Unter Anwendung eines binären Gradienten, ähnlich dem hier vorgestellten, gelang ihnen mit dieser stationären Phase die Trennung der EPA-PAH mit der CEC in 100 min.

7.4.3 Trennung von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen bei Gradientenelution mit Dimethylsulfoxid-haltiger mobiler Phase

In Abschnitt 6.5, S. 83 wurde gezeigt, daß sich mit DMF und DMSO als weiterem organischem Modifizier die Selektivität des Trennsystems steigern läßt. Deshalb wurde versucht, die EPA-PAH durch Fließmittelgradienten zu trennen, in deren zeitlichem Verlauf der Gehalt der mobilen Phase an DMSO und Phosphatpuffer verändert wurde. Als Fließmittel A und B wurden in diesen Versuchen verwendet: A: AcCN/Phosphatpuffer 8:2 v/v, B: AcCN/Phosphatpuffer/DMSO 4:4:2 v/v. Dabei wurde im Verlauf der Analyse der Anteil von B in der mobilen Phase und damit ihr Gehalt an DMSO und Phosphatpuffer gesenkt. Bei einer Erhöhung des Anteils von B im Laufe der Analyse ist mit einer Störung des Flusses der mobilen Phase zu rechnen, da μ_{eo} der nachfolgend gelieferten mobilen Phase kleiner ist, als der vorangegangenen gelieferten.

Abb. 36 zeigt eine Trennung, die bei Gradientenelution mit DMSO-haltiger mobiler Phase erhalten wurde. Das starke Ansteigen der Grundlinie mit der Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase ist auf steigende Unterschiede in den Brechungsindices der mobilen und der stationären Phase zurückzuführen.

nären Phase begründet, was zu einem verstärkten Intensitätsverlust des zur Detektion eingestrahlt Lichts führt.

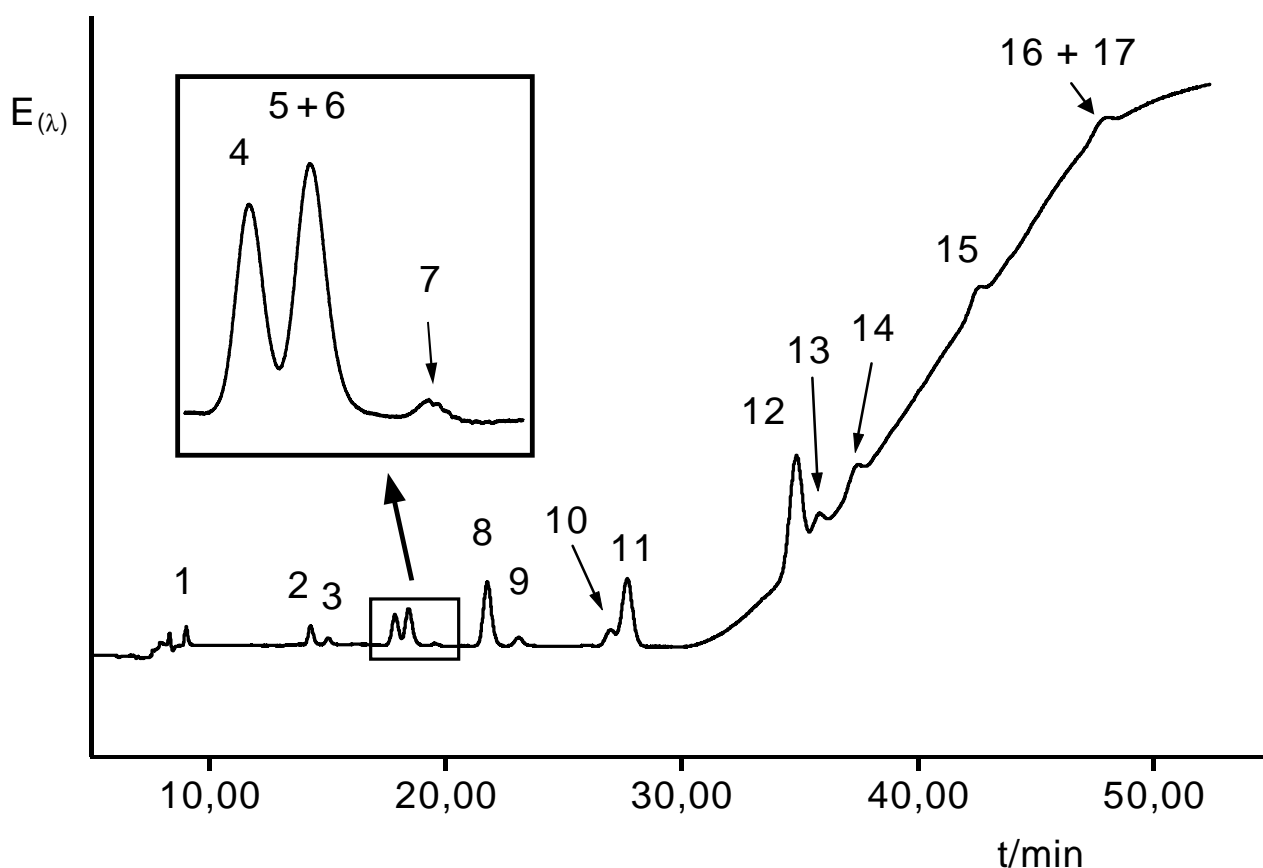


Abb. 36: Trennung der EPA-PAH bei Gradientenelution mit DMSO-haltiger mobiler Phase. Kapillarsäule, $L = 355(310) \text{ mm} \times 100 \text{ } \mu\text{m}$ I.D., stationäre Phase Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \text{ } \mu\text{m}$, mobile Phasen, A: AcCN/Phosphatpuffer ($c = 1,25 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$) 8:2 v/v, B: AcCN/Phosphatpuffer ($c = 1,25 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 7,2$)/DMSO 4:4:2 v/v, Gradientenprogramm, 100 % B für 15 min, 100-0 % B in 20 min, 0 % B für 25 min, Trennungsspannung 25 kV, Flußrate 0,2 mL/min, photometr. In-column-Det., $\lambda = 280 \text{ nm}$, Analyte siehe Abb. 34

Infolge des hohen Gehalts der mobilen Phase an DMSO und Phosphatpuffer zu Beginn der Analyse ist t_0 sehr groß ($t_0 = 9,41$ min). Das Chromatogramm zeigt den Peak von Thioharnstoff und 14 weitere Peaks. Die PAH werden also nicht vollständig voneinander getrennt. Acenaphthen und Phenanthren werden koeluiert, ebenso Indeno(1,2,3-c,d)pyren und Benzo(g,h,i)perylen. Dies bedeutet gegenüber der isokratischen Elution (Abb. 34) einen Informationsverlust des Chromatogramms bei gleichzeitiger Verdopplung der Analysendauer.

Ferner sind die Peaks verbreitert. In Tab. 17 sind die Werte für die Halbwertsbreite $w_{1/2}$ und die Auflösung R für aufeinanderfolgend eluierte Peakpaare für die in Abb. 36 gezeigte Trennung aufgeführt. Für alle Peaks ist $w_{1/2}$ etwa doppelt so groß als für die Peaks der in Abb. 35 gezeigten Trennung. Durch den hohen DMSO-Gehalt der mobilen Phase zu Beginn des chromatographischen Laufs, ist der Druck in dem System infolge der größeren Viskosität der mobilen Phase größer als bei Verwendung von mobilen Phasen, die nur AcCN und Phosphatpuffer enthalten. Durch den höheren Druck wird ein längerer Probenpfropf injiziert. Die größere Halbwertsbreite der Peaks bei der Gradientenelution mit DMSO-haltiger mobiler Phase ist also auf eine Zunahme der Bandenverbreiterung durch die Probenaufgabe zurückzuführen.

Abb. 36 zeigt das beste Ergebnis, welches bei Gradientenelution mit DMSO-haltiger mobiler Phase erhalten wurde. Es wurden auch Gradienten mit einem geringeren Anfangsgehalt an DMSO in der mobilen Phase und Gradienten mit einer früheren Verringerung des DMSO-Gehalts im Verlauf der Analyse als bei der in Abb. 36 gezeigten Trennung eingesetzt. In allen Fällen wurden Chrysen und Benzo(a)anthracen koeluiert.

Tab. 17: Halbwertsbreite $w_{1/2}$ und Auflösung R aufeinander folgend eluierter Peaks der EPA-PAH bei Gradientenelution mit DMSO-haltiger mobiler Phase

Analyt	$w_{1/2}$ /min	R
Naphthalin	0,24	1,82
Acenaphthylen	0,26	5,98
Fluoren	0,32	1,07
Acenaphthen	0,34	0,00
Anthracen	0,34	2,36
Phenanthren	0,25	4,24
Fluoranthren	0,39	2,04
Pyren	0,41	5,28
Chrysen	0,50	0,84
Benzo(a)anthracen	0,51	8,56
Benzo(b)fluoranthren	0,52	1,20
Benzo(k)fluoranthren	0,52	1,07
Benzo(a)pyren	1,36	2,52
Dibenz(a,h)anthracen	1,18	3,40
Indeno(1,2,3-c,d)perylene	0,73	0,00
Benzo(g,h,i)perylene	0,73	-

Meßbedingungen siehe Abb. 36

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit trägt zur instrumentellen Entwicklung der CEC mit gepackten Kapillarsäulen bei. Photometrische Detektion in der Packung (In-column-Detektion, ICD) und außerhalb der Packung (On-column-Detektion, OCD) wurden miteinander verglichen. Für retardierte Analyte wird bei ICD gegenüber OCD eine Signalverstärkung beobachtet. Für beide Detektionsmodi werden lineare Kalibrierfunktionen erhalten. Bei ICD tritt neben dem Basislinien-Rauschen ein Signal-Rauschen auf, welches die Wiederholpräzision gegenüber OCD nachteilig beeinflusst. Die Nachweisgrenze ist vom Detektionsmodus abhängig.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Optimierung der elektrokinetischen Probenaufgabe in der CEC. Es wurde gezeigt, daß die Länge des injizierten Probenpfropfs bis zu einem Schwellenwert keinen Einfluß auf die Bandenverbreiterung hat. Gleichungen wurden experimentell verifiziert, mit denen optimale Probenaufgabeparameter aus leicht zugänglichen chromatographischen Größen bestimmt werden können. Durch die Wahl eines Lösungsmittels mit geringerer Elutionsstärke als die mobile Phase zum Lösen der Probe, läßt sich die Probe auf dem Säulenkopf fokussieren. Dadurch können große Probenvolumina aufgegeben werden, und die Empfindlichkeit des Verfahrens kann gesteigert werden.

Um Leitlinien für die Optimierung der Zusammensetzung der mobilen Phase in der CEC zu entwickeln, wurde der Einfluß der Zusammensetzung der mobilen Phase auf die elektroosmotische Beweglichkeit, die Retention der Analyte und die Effizienz des chromatographischen Systems untersucht. Die Geschwindigkeit des EOF wird durch die Ionenstärke, den Gehalt des organischen Modifiers und die Wahl des organischen Modifiers der mobilen Phase beeinflusst. Zur Erzielung eines hinreichend schnellen, stabilen EOF ist AcCN als Modifier besonders geeignet. Durch den Wechsel des Modifiers läßt sich die Selektivität des Trennsystems stark beeinflussen. Die Wahl des Modifiers beeinflusst auch die Effizienz. Die Veränderung des Gehalts des Modifiers in der mobilen

Phase hat auf die Retention ungeladener Analyte in der RP-CEC denselben Einfluß wie in der RP-HPLC. Durch ternäre mobile Phasen läßt sich die Selektivität des Trennsystems gezielt verbessern.

Es wurde ein apparatives System vorgestellt, mit dem sich Fließmittelgradienten in der CEC anwenden lassen. Kernstück der Apparatur ist eine Niederdruck-Gradienten-HPLC-Pumpe. Die Probenaufgabe erfolgt über einen HPLC-Injektor. Infolge der kleinen Flußraten durch gepackte Kapillarsäulen ist ein Flow-split nötig. Die vorgestellte Apparatur setzt die programmierten Gradienten mit hoher Genauigkeit um. Dadurch wird eine hohe Wiederholpräzision der Retentionszeiten erreicht. Ein Gradient der Zusammensetzung der mobilen Phase wirkt sich in der RP-CEC auf die Trennung ungeladener Analyte genauso aus, wie es für die RP-HPLC erwartet wird.

9 Literaturverzeichnis

- [1] M.M. Robson, M.G. Cikalo, P. Myers, M.R. Euerby,
K.D. Bartle,
Capillary-electrochromatography: a review,
J. Microcol. Sep. 9 (1997), 357

- [2] M. Novotny,
Recent advantages in microcolumn liquid chromatography,
Anal. Chem. 60 (1988), 500 A

- [3] F.E.P. Mikkers, F.M. Evaerts, T.P.E.M. Verheggen,
High performance zone electrophoresis,
J. Chromatogr. 169 (1979), 11

- [4] J. Vindevogel, P. Sandra,
Introduction into micellar electrokinetic chromatography,
Hüthig Verlag 1992

- [5] M.T. Dulay, C. Yan, D.J. Rakestraw, R.N. Zare,
Automated capillary electrochromatography: reliability and re-
producibility studies,
J. Chromatogr. A 725 (1996), 361

- [6] R.J. Boughtflower, T. Underwood, C.J. Paterson,
Capillary electrochromatography: Some important considera-
tions in the preparation of packed capillaries and the choice of
the mobile phase buffers,
Chromatographia 40 (1995), 329

- [7] J.L. Liao, N. Chen, C. Ericsson, S. Hjerten,
Preparation of continuous beds derivatized with one-step alkyl and
sulfonate groups for capillary electrochromatography
Anal. Chem. 68 (1996), 3468

- [8] H. Rebscher, U. Pyell,
A method for the experimental determination of contributions to
band broadening in electrochromatography with packed ca-
pillaries,
Chromatographia 38 (1994), 737

- [9] J.H. Knox, I.H. Grant,
Electrochromatography in packed tubes using 1.5 to 50 μm sili-
cagels and ODS bonded silicagels,
Chromatographia 32 (1991), 317

- [10] M.M. Dittmann, G.P. Rozing,
Capillary electrochromatography: Investigations of the influence
of mobile phase and stationary phase properties on electro-
osmotic velocity, retention, and selectivity,
J. Microcol. Sep. 9 (1997), 399

- [11] M.M. Dittmann, G.P. Rozing,
Capillary electrochromatography - a high efficiency microsepa-
ration technique,
J. Chromatogr. A 744 (1994), 63

- [12] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg,
Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes
of nonlinearity in Chromatography,
Chem. Engineering Science 5 (1956), 271

- [13] G. Ross, M.M. Dittmann, G.P. Rozing,
Enhancement of LC separations in packed capillary columns by
means of electrically driven mobile Phases,
Internat. Lab. ,May 1996, 10 A

- [14] G. Kortüm,
Lehrbuch der Elektrochemie,
Verlag Chemie 1972

- [15] D.C. Grahame,
The electric double layer and the theory of electrocapillarity,
Chem. Rev. 41 (1947), 441

- [16] C. Horváth,
Capillary-electrochromatography: Do we need or do we have a
new liquid separation technique for analysis?,
Würzburger Kolloquium Kapillarelektrophorese-Chromatographie,
Fortschrittsberichte 1997, Bertsch Verlag 1997

- [17] W.D. Pfeffer, E.S. Yeung,
Open-tubular liquid chromatography with surfactant enhanced
electroosmotic flow,
Anal. Chem. 62 (1990), 2178

- [18] T. Tsuda, K. Nomura, G. Nakagawa,
Open-tubular microcapillary liquid chromatography with
electroosmotic flow using a UV-detector
J. Chromatogr. 248 (1982), 241

- [19] K.W. Whitaker, M.J. Sepaniak,
Non aqueous packed capillary electrokinetic chromatographic separations of large polycyclic aromatic hydrocarbons and fullerenes,
Electrophoresis 15 (1994), 1341
- [20] H. Rebscher, U. Pyell,
In-column versus on-column fluorescence detection in capillary electrochromatography,
J. Chromatogr. A 737 (1996), 171
- [21] M.R. Taylor, P. Teale,
Gradient capillary electrochromatography of drug mixtures with UV and electrospray ionisation mass spectrometric detection,
J. Chromatogr. A 768 (1997) 89
- [22] D.B. Gordon, G.A. Lord, D.J. Jones,
Development of packed capillary column electrochromatography/mass spectrometry,
Rap. Comm. in Mass Spec. 8 (1994), 544
- [23] V. Pretorius, B.J. Hopkins, J.D. Schieke,
Electroosmosis: A new concept for high-speed liquid chromatography,
J. Chromatogr. 99 (1974), 23
- [24] T. Adam, K.K. Unger,
Stabile und effiziente Trennsäulen für die Elektrochromatographie,
Würzburger Kolloquium Kapillarelektrophorese-Chromatographie,
Fortschrittsberichte 97, Bertsch-Verlag 1997

- [25] C. Yan, R. Dadoo, H. Zhao, R.N. Zare, D.J. Rakestraw,
Capillary Electrochromatography: Analysis of polycyclic aromatic
hydrocarbons,
Anal. Chem. 67 (1995), 2026
- [26] M.R. Euerby, D. Gilligan, C.M. Johnson, S.P.C Roulin, P. Myers,
K.D. Bartle,
Applications of capillary electrochromatography in pharmaceutical
analysis,
J. Microcol. Sep. 9 (1997), 373
- [27] N.W. Smith, M.B. Evans,
The analysis of pharmaceutical compounds using electrochroma-
tography,
Chromatographia 38 (1994), 649
- [28] F. Lelièvre, C. Yan, R.N. Zare, P. Gareil,
Capillary electrochromatography: Operating characteristics and
enantiomeric separations,
J. Chromatogr. A 723 (1996), 145
- [29] C Yan, R. Dadoo, R.N. Zare, D.J. Rakestraw, D.S. Anex,
Gradient elution in capillary electrochromatography,
Anal. Chem. 68 (1996), 2726
- [30] F.T. Hafner, H. Engelhardt,
Applications of 1.5 μm nonporous silica particles in CEC,
Vortrag auf der Analytica Conference 98, München 1998

- [31] S. Lüttke, T. Adam, K.K. Unger,
Application of 0.5 μm porous silanized silica beads in electro-
chromatography,
J. Chromatogr. A, 786 (1997), 229
- [32] C. Fujimoto, Y. Fujise, E. Matsuzawa,
Fritless packed columns for capillary electrochromatography: Sepa-
ration of uncharged compounds on hydrophobic hydrogels,
Anal. Chem. 68 (1996), 2753
- [33] T. Eimer,
Elektroendoosmotische Kapillar-Chromatographie mit Fused silica
Kapillaren mit 100 und 75 μm Innendurchmesser und Superspher
100 RP-18, 4 μm als Packungsmaterial,
Diplomarbeit, Mainz 1992
- [34] R.T. Kennedy, J.W. Jorgenson,
Preparation and evaluation of packed capillary liquid chromato-
graphy columns with inner diameters from 20 to 50 μm ,
Anal. Chem. 61 (1989), 1128
- [35] C. Yan,
Electrokinetic packing of capillary columns,
U.S.-Patent No. 5,453,163 (1995)
- [36] H. Rebscher, U. Pyell,
Instrumental developements in capillary electrochromatography,
Chromatographia 42 (1996), 171

- [37] C. Yan, D. Schaufelberger, F. Erni,
Electrochromatography and micro high-performance liquid chromatography with 320 μm I.D. packed columns,
J Chromatogr. A 670 (1994), 15
- [38] E.J. Guthrie, J.W. Jorgenson,
On-column fluorescence detector for open tubular capillary liquid chromatography,
Anal. Chem. 56 (1984), 483
- [39] H. Chen, C. Horváth,
On-column UV-absorption detection in liquid chromatography with packed capillaries,
Anal. Meth. and Inst. 2 (1995), 122
- [40] H. Rebscher,
Der Einfluß instrumenteller Parameter auf elektrochromatographische Trennungen mit gepackten Kapillarsäulen,
Dissertation, Marburg 1996
- [41] J.C. Sternberg,
Extracolumn contributions to chromatographic band broadening,
Adv. Chromatogr. 2 (1966), 205
- [42] R.P.W. Scott,
Liquid chromatography column theory,
John Wiley & Sons 1992

- [43] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge,
A new form of chromatogram employing two liquid phases
1. A theory of chromatography
2. Application to the micro-determination of the higher mono-
amine-acids in proteins,
Biochem. J. 35 (1941), 1358
- [44] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando,
Band broadening in electrokinetic chromatography with micellar
solutions and open-tubular capillaries,
Anal. Chem. 61 (1989), 251
- [45] M.R. Euerby, D.G. Gilligan, C.M. Johnson, K.D. Bartle,
Step-gradient capillary electrochromatography,
Analyst 122 (1997), 1087
- [46] J.J. Pesek, M.T. Matyska,
Separation of tetracyclines by high-performance capillary electro-
phoresis and capillary electrochromatography,
J. Chromatogr. A 736 (1996), 313
- [47] A.S. Rathore, C. Horváth,
Capillary electrochromatography: theories on electroosmotic flow
in porous media,
J. Chromatogr. A, 781 (1997), 185
- [48] H. Rebscher, A. Banholczer, U. Pyell,
Influence of sample plug width in capillary electrochromatography,
J. Chromatogr. A 779 (1997), 155

- [49] P.D. Grossman in P.D. Grossman, J.C. Colburn (Hrsg.),
Capillary electrophoresis. Theory and practice,
Academic Press 1992
- [50] G. Wedler,
Lehrbuch der physikalischen Chemie,
VCH Weinheim 1987
- [51] Q. H. Wan,
Capillary electrochromatography: effect of electrolyte concentration on electroosmotic flow and column efficiency,
J. Chromatogr. A 782 (1997), 181
- [52] G. Choudhary, C Horváth,
Dynamics of capillary electrochromatography. Experimental study on the electroosmotic flow and conductance in open and packed capillaries,
J. Chromatogr. A 781 (1997), 185
- [53] C. Schwer, E. Kenndler,
Electrophoresis in fused-silica capillaries: The influence of organic solvents on electroosmotic velocity and the ζ potential,
Anal. Chem. 63 (1991), 1801
- [54] T.C. Schunk, M. F. Burke,
Bonded phase conformation and solvation effects on stationary phase structure in reversed phase liquid chromatography,
J. Chromatogr. A 656 (1993), 289
- [55] G. Aced, H. J. Möckel,
Liquidchromatographie,
VCH Weinheim 1991

- [56] U. Pyell,
Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) und Kapillar-Elektrochromatographie - miniaturisierte Trenntechniken. Beiträge zur instrumentellen Entwicklung und Verfahrensoptimierung, Habilitationsschrift, Marburg 1997
- [57] C. Wohlfahrt, O. Madelung (Hrsg.),
Landolt-Börnstein-Zahlenwerte und Funktionen, Neue Serie, Gruppe IV, Bd. 6,
Springer Verlag 1991
- [58] B. Behnke, E. Bayer,
Pressurized gradient electro high performance liquid chromatography,
J. Chromatogr. A 680 (1994), 93
- [59] M.R. Taylor, P. Teale, S.A. Westwood, D. Perret,
Analysis of corticosteroids in biofluids by capillary electrochromatography,
Anal. Chem. 69 (1997), 2554
- [60] V.R. Meyer,
Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie,
Salle + Sauerländer, 7. Auflage, 1992
- [61] S. Lamotte, H. Engelhardt.
Schnelle PAK-Trennung in nur 15 Minuten,
GIT 4/98 (1998), 352

- [62] L.C. Sander, S.A. Wise,
Recent advances in bonded phases for liquid chromatography,
CRC Crit. Rev. Anal. Chem. 18 (1987), 299
- [63] D.R. Lide, H.P.R. Frederikse (Hrsg.),
CRC Handbook of chemistry and physics,
75th. Edition, CRC Press Inc. 1994

10 Anhang

10. 1 Verwendete Chemikalien

Stationäre Phasen:

YMC, $d_p = 1,5 \mu\text{m}$, mittlere Porengröße 10 nm, Porenvolumen 0,5 mL/g, spezifische Oberfläche 200 m²/g, YMC Europe GmbH, Schermbeck.

Nucleosil 100-3 ODS, $d_p = 3 \mu\text{m}$, mittlere Porengröße 10 nm, spezifische Oberfläche 300 m²/g, nachsilanisiert mit Hexamethyldisilazan, Kohlenstoffanteil 14 %, w/w, Macherey-Nagel, Düren.

Nucleosil 100-3, $d_p = 3 \mu\text{m}$, mittlere Porengröße 10 nm, spezifische Oberfläche 300 m²/g, nicht modifiziert, Macherey-Nagel, Düren.

Das unmodifizierte Nucleosil wurde zur Herstellung der Abschlußfritten verwendet.

Analyte

Benzoessäuremethylester, Benzoessäureethylester, Thioharnstoff, Naphthalin, Phenol: Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg.

Benzoessäurepropylester, Benzoessäure-*p*-tolylester, Benzoessäurephenylester, Benzoessäurebenzylester, Benzoessäurebutylester, Benzoessäure-*i*-pentylester: Merck, Darmstadt.

2-Amino-4-nitrotoluol, 2,4-Dinitrotoluol, 2,6-Dinitrotoluol, *p*-Nitrotoluol: Aldrich, Steinheim.

Pyren, Acenaphthylen, Acenaphthen: ChemService, West Chester, GB.

p-Nitroanilin: Riedel, Seelze.

2,4,6-Trinitrotoluol: PromoChem, Wesel.

EPA-PAH (Naphthalin, Acenaphthylen, Fluoren, Acenaphthen, Phenanthren, Anthracen, Flouranthren, Pyren, Chrysen, Benzo(a)anthracen, Ben-

zo(b)fluoranthren, Benzo(k)fluoranthren, Benzo(a)pyren, Dibenz(a,h)anthracen, Indeno(1,2,3-c,d)pyren, Benzo(g,h,i)perylene): PromoChem, Wessel.

Die Analyte hatten die Reinheitsgrade „rein“, bzw. „analysenrein“. Sie wurden ohne weitere Aufarbeitung direkt eingesetzt.

Mobile Phasen

Acetonitril, Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Tetrahydrofuran, Aceton: Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg.

Alle genannten Lösungsmittel hatten den Reinheitsgrad „rein“. Acetonitril wurde vor der Benutzung destilliert.

Wasser, bidestilliert: FB Chemie der Philipps-Universität Marburg.

Di-Natriumhydrogenphosphat, Natrium-di-hydrogenphosphat, analysenrein: FB Chemie der Philipps-Universität Marburg.

Sonstige Chemikalien

Natriumsilikatlösung, rein, zur Herstellung der Abschlußfritten: FB Chemie der Philipps-Universität Marburg.

10.2 Verwendete Geräte

Apparatur für isokratische CEC

Hochspannungsquelle: FUG HCN 35-35000, FUG, Rosenheim.

Die Hochspannungsquelle wurde mit einer analogen Steuereinheit ausgerüstet, die das Anlegen einer einzustellenden Spannung für ein einzu-

stellendes Zeitintervall zur elektrokinetischen Probenaufgabe ermöglicht. Dabei wird die Spannung gedämpft auf den eingestellten Wert gebracht und wieder entsprechend zurückgeregelt.

HPLC-Pumpe: Shimadzu LC-6A, Shimadzu, Kyoto, Japan.

Detektor: Spectra 100 variable UV/Vis CE Detector, Thermo Separation Products, San Jose, USA.

Gradienten-CEC-Apparatur

Hochspannungsquelle und Detektor: Siehe Angaben zur Apparatur für isokratische CEC.

Niederdruck-Gradienten-HPLC-Pumpe: Shimadzu LC-10 AD, in Verbindung mit magnetischem Schaltventil FCV-10 AL, beide Shimadzu, Kyoto, Japan.

Probeninjektor: Cheminert C1W, 6-Wege Ventil mit externer Probenschleife und manueller Bedienung, Valco Instruments Co. Inc., Houston, USA.

Auswertung/Datenaufnahme

Die Datenaufnahme erfolgte über einen A/D-Wandler (SS 240, Scientific Software Inc., San Ramon, USA) mit einem Personal-Computer. Als Datenaufnahme- und Auswertungsprogramm wurde das Programm EZ-Chrom, Scientific Software Inc., San Ramon, USA verwendet.

Packapparatur

Pumpe: Haskel DSTV 122, Armaturenbau Wesel, Wesel.

Packautoklav: HPLC-Säule, L = 4 cm, I.D. = 4 mm, Knauer, Berlin.

Kapillarmaterial

Polymicro Technologies Inc., Phoenix, USA.

Ceramoptec GmbH, Bonn.

Von beiden Herstellern wurden Kapillaren mit verschiedenem I.D. benutzt. Die O.D. der Kapillaren beider Hersteller betragen 340 – 370 μm .

Fittings für Kapillarsäulen

PEEK-Fingertight Schrauben und Ringkeile in Verbindung mit PEEK-Führungsröhrchen für Kapillaren, I.D. = 400 μm : Upchurch Scientific, Oak Harbour, USA.

pH-Wert-Bestimmungen

Präzisions-pH-Meter E 510, Metrohm, Herisau, Schweiz.

Bestimmung der Viskosität

Ubbelohde-Viskosimeter 53001/0a, Kapillar-I.D. 0,53 mm, Schott, Mainz.

Zur Bestimmung der Viskosität einer Flüssigkeit mit dem Ubbelohde-Viskosimeter wird die Zeit gemessen, die ein gegebenes Volumen der Flüssigkeit benötigt, um durch die Kapillare des Viskosimeters zu strömen. Dabei liegt an der Kapillare ein konstanter Druckgradient an. Bei dem verwendeten Viskosimeter wurde die Durchlaufzeit automatisch durch zwei Lichtschranken bestimmt. Das Viskosimeter wurde im Wasserbad auf 25° C temperiert. Zur Bestimmung der Viskosität der Mischphase aus DMF/Phosphatpuffer wurde zunächst die Durchlaufzeit $t_{D,0}$ des reinen DMF bestimmt. Es wurden zwei Messungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Für $t_{D,0}$ wurden 147,6 s ermittelt. Für die Durchlaufzeit der Mischphase $t_{D,M}$ wurden 334,06 s ermittelt ($n = 2$). Daraus lässt sich nach Gl. 31 die Viskosität η der Mischphase berechnen.

$$\eta = \left(\frac{t_{D,M} - t_{D,0}}{t_{D,0}} + 1 \right) \cdot \eta_0 \quad (31)$$

Darin ist η_0 die Viskosität des reinen DMF. η_0 beträgt bei 25° C $7,94 \cdot 10^{-4}$ kg m⁻¹s⁻¹ [63]. Damit erhält man für η $18,0 \cdot 10^{-4}$ kg m⁻¹s⁻¹.